

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANÇON
ECOLE DOCTORALE « ENVIRONNEMENTS-SANTE »

Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en
Sciences de la Vie et de la Santé

FONCTION ET DYSFONCTION DES SYSTEMES D'EFFLUX ACTIF
CHEZ LES SOUCHES CLINIQUES DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA

Présentée et soutenue publiquement par

Sophie GUÉNARD

Le 8 octobre 2013

Sous la direction de Mr le Professeur Patrick Plésiat

Membres du jury :

Dr. Sophie de BENTZMANN

Rapporteur

Pr. Youri GLUPCZYNSKI

Rapporteur

Dr. Jean-Michel BOLLA

Examineur

Dr. Katy JEANNOT

Examineur

Pr. Patrick PLÉSIAT

Directeur de thèse

Remerciements

Chaque thèse de Doctorat à son histoire. La mienne, aux côtés du « Pyo », me paraît un peu singulière mais probablement moins que d'autres. Après mon arrivée au laboratoire, pleine d'espoir et d'élan, le chemin emprunté pour arriver à cette étape fut long, parfois difficile, semé d'obstacles, de détours ou encore de voies (presque) sans issues me conduisant à des alternances entre pics de fougue et d'enthousiasme et descentes au creux de la vague. Aussi dure a-t-elle été, cette route sinueuse et escarpée fut une merveilleuse aventure humaine et scientifique. Fort heureusement, elle n'a pas été parcourue en solitaire et n'a été possible que grâce à de nombreuses personnes rencontrées au cours de ce périple et qui m'ont apporté de l'énergie, de la volonté, de la confiance et de l'aide.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements et ma reconnaissance au Professeur Patrick Plésiat, directeur de ce travail de thèse. *Chef, je vous remercie sincèrement pour la confiance que vous m'avez accordée en me proposant cette aventure ainsi que pour vos nombreux conseils, remarques et suggestions qui m'ont permis d'améliorer constamment la qualité de ce travail. Toujours disponible, tenace, et jamais à court d'idées, vous m'avez accompagné avec patience et conseillé avec pertinence dans le cheminement scientifique du travail que nous accomplissons ensemble depuis 4 années. Je vous remercie également pour les échanges très enrichissants que nous avons eus et pour tous ces moments de bonne humeur partagés au cours de déplacements, colloques, réunions ou discussions de fin de journée ; qui ont rythmé cette thèse. Je tiens enfin à vous remercier pour votre soutien dans la création de notre entreprise, votre optimisme a été un moteur dans notre démarche.*

Mes plus sincères remerciements vont également à Madame Sophie de Bentzmann et Monsieur Youri Glupczynski, pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse, ainsi qu'à Monsieur Jean-Michel Bolla et Madame Katy Jeannot, pour avoir accepté de l'évaluer.

Je remercie particulièrement Katy Jeannot pour ses précieux conseils, sa gentillesse et son soutien au quotidien. Son expertise scientifique a contribué de manière notable à l'élaboration de ce travail. *Katy je t'en suis d'une grande reconnaissance, merci pour tout ce que tu as fait pour moi.*

Je tiens à adresser des remerciements tous particuliers à Catherine Llanes grâce à qui mon aventure dans ce milieu de la recherche a débuté. Au-delà des échanges scientifiques, il s'agit surtout d'une belle rencontre humaine. *Catherine, un grand merci pour votre soutien et vos encouragements quotidiens.*

Une place à part est consacrée à Cédric, mon ex-collègue, futur associé et ami. Nous avons avancé côte à côte durant ces quelques années. *Tout simplement merci d'être ce que tu es, merci pour ton soutien et la confiance que tu m'accordes pour la création de notre entreprise.*

Je remercie chaleureusement toute l'équipe de Bactériologie : ma petite Charlotte, Aurélie, Damien, Caroline, Marjorie, Emeline, Amélie, sans oublier Gérard, Isabelle, Didier, les dames de la laverie et notre Angéline national. *Je vous adore.*

Un grand merci à mes collègues « parasites » : Coralie, mon amie Steffi, Mallory, Alex, Audrey, Jenny, Sandrine, Bénédicte, Anne-Cécile et Stéphane mais également au couple infernal de « cancéro » : Elise et François.

Mes pensées se tournent également vers Fabrice et Amandine. *Merci pour toutes ces belles séquences, ce travail est aussi un peu le vôtre.*

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces quelques années et à celles que j'aurais pu oubliées.

Je finirai par remercier mes parents qui m'ont toujours laissé une grande liberté dans la conduite de mes études malgré le style très personnel avec lequel je les ai menées, à mon frère, Jenny, Ma tata cailloux, Fifi, Ma gram's, Mimi, Mijo, Serge, Anouk et Pauline, ma belle-famille et surtout mon amoureux. *Je crois que j'ai beaucoup de chance d'avoir une famille comme vous, d'une telle générosité, d'une grande compréhension et d'un soutien infaillible. Merci d'être toujours là pour moi. Je vous aime.*

Abréviations

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine di-phosphate
AmpC++	surproduction de la β -lactamase AmpC
APH	aminoside phosphoryl-transférase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATP	adénosine tri-phosphate
BET	bromure d'éthidium
BGN-NF	bacille à Gram négatif non fermentaire
BLSE	béta-lactamase à spectre étendu
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CF	<i>cystic fibrosis</i>
CMB	concentration minimale bactéricide
CMI	concentration minimale inhibitrice
CRCM	Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose
CT	<i>cycle threshold</i>
CTAB	bromure de cetyltriméthylammonium
Da	dalton
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNTP	désoxyribonucléoside tri-phosphate
E	efficacité
EDTA	acide éthylène diamine-tétracétique
FRT	<i>flippase recognition sequence</i>
g	accélération de la pesanteur
h	heure
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HK	histidine kinase
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HTH	hélice-tour-hélice
KCN	cyanure de potassium
kb	kilobase
L	litre
LPS	lipopolysaccharide
MATE	<i>multidrug and toxic compound extrusion</i>
McF	Mac Farland
MexAB-	déficiences du système MexAB-OprM
MexAB+	système MexAB-OprM fonctionnel
MexAB++	mutant surproducteur du système MexAB-OprM
MexXY++	mutants surproducteurs du système MexXY/OprM
MDCK	<i>madin-darby canine kidney</i>
MDR	<i>multi-drug resistant</i>
Mpb	million de paires de bases
MFP	<i>membrane fusion protein</i>

MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
min	minute
mL	millilitre
mM	millimolaire
MOPS	acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
NBD	<i>nucleotide-binding domain</i>
ng	nanogramme
nm	nanomètre
NPN	n-phényl-1-naphthylamine
NPPC	nitrophényl-phosphorylcholine
°C	degré Celsius
OMP	<i>outer membrane protein</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
p/v	poids/volume
pb	paire de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDF-Is	<i>peptide deformylase inhibitors</i>
Pi	phosphate inorganique
PIA	<i>Pseudomonas isolation agar</i>
PLP	protéine liant la pénicilline
PQS	<i>Pseudomonas aeruginosa quinolone signal</i>
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i>
RND	<i>resistance nodulation cell division</i>
rpm	tours par minute
RR	régulateur de réponse
RT(q)-PCR	<i>reverse transcription (quantitative) PCR</i>
s	seconde
SDS	sodium dodécyl sulfate
SMR	<i>small multidrug resistance</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
TAE	tris acétate EDTA
TicHS	<i>ticarcillin hypersusceptibility</i>
TicHS/M	TicHS masqué
TMD	<i>transmembrane domain</i>
TMS	<i>transmembrane segment</i>
U	unité
UFC	unité formant colonie
UV	ultra-violet
V	volt
v/v	volume/volume
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
WT	<i>wild type</i>
µg	microgramme
µL	microlitre
µM	micromolaire
3D	trois dimensions

Liste des Figures

Figure 1. Représentation schématique des 5 familles de transporteurs.	24
Figure 2. Structure des transporteurs eucaryotes de type ABC.	25
Figure 3. Mécanisme de transport des systèmes ABC.	26
Figure 4. Structure tripartite du système d'efflux MexAB-OprM (a) et structure cristallographique du transporteur MexB (b) (<i>P. aeruginosa</i>).	27
Figure 5. Représentation schématique du système de transport de AcrB (<i>E. coli</i>).	28
Figure 6. Structure 3D de la protéine MdfA (12TMS) (<i>E. coli</i>).	29
Figure 7. Mécanisme de transport de MdfA (<i>E. coli</i>).	29
Figure 8. Structure du transporteur EmrE de <i>E. coli</i> lié au tétraphényl phosphonium (en rose).	30
Figure 9. Mécanisme de transport du système EmrE de <i>E. coli</i> .	30
Figure 10. Structure du transporteur NorM (<i>N. gonorrhoeae</i>) lié à l'anticorps utilisé pour la cristallisation (hélices rose clair) et au tétraphényl phosphonium (structures en rose foncé).	31
Figure 11. Mécanisme présumé de fonctionnement de l'antiporteur MATE NorM (<i>N. gonorrhoeae</i>).	32
Figure 12. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de <i>Acinetobacter</i> impliqués dans la résistance aux antibiotiques.	42
Figure 13. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de <i>A. xylosoxidans</i> impliqués dans la résistance aux antibiotiques.	50
Figure 14. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de <i>Burkholderia</i> impliqués dans la résistance aux antibiotiques.	53
Figure 15. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de <i>S. maltophilia</i> impliqués dans la résistance aux antibiotiques.	60
Figure 16. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de <i>P. putida</i> impliqués dans la résistance aux antibiotiques.	67
Figure 17. Représentation schématique des opérons codant les systèmes d'efflux RND de <i>P. aeruginosa</i> impliqués dans la résistance aux antibiotiques.	72
Figure 18. Représentation schématique de la régulation de l'expression de l'opéron mexAB-oprM chez <i>P. aeruginosa</i> .	73
Figure 19. Niveaux d'expression relatifs, en milieu LB, des systèmes RND impliqués dans la résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques selon la phase de croissance.	75
Figure 20. Structure de la région leader située en amont du locus PA5471-PA5470.	81
Figure 21. Représentation schématique de la régulation de l'expression de l'opéron mexXY chez <i>P. aeruginosa</i> .	84
Figure 22. Représentation schématique de la régulation de l'expression de l'opéron mexEF-oprN chez <i>P. aeruginosa</i> .	89

Figure 23. Structure de la ticarcilline (a) et de la témocilline (dérivé 6- α -méthoxy) (b).	98
Figure 24. Représentation schématique des 4 allèles codant pour l'ARN ribosomal de la souche PAO1.	145
Figure 25. Localisation des mutations dans l'ARN 23S identifiées chez les mutants sélectionnés in vitro (PAOW1 et KJD9) et chez les souches cliniques 3136 et 3564.	146
Figure 26. Courbes de croissance de la souche PAO1 et des mutants PAOW1 et KJD9 à 37°C (a) et 44°C (b).	147
Figure 27. Résistance à l'amikacine (AMK) des souches sélectionnées et de leurs mutants Δ mexXY et Δ oprM.	149
Figure 28. Courbes représentatives de l'activité perméabilisante de la gentamicine (GEN) sur la membrane externe des souches PAO1 (a) et 4194 (b).	150
Figure 29. Antibiotogrammes de la souche de référence PAO1 (a) et d'une souche clinique de phénotype TicHS (b).	152
Figure 30. Profils électrophorétiques de l'ADN génomique des couples isogéniques 3020R/3020S et 3525/3807 après restriction par DraI.	153
Figure 31. Alignements de MexA (1a) et MexB (1b) avec leurs homologues d'autres espèces.	154
Figure 32. Localisation des mutations identifiées chez les souches cliniques sur les structures 3D des protéines MexA (monomère) (a) et MexB (trimère) (b).	155
Figure 33. Distribution des souches déficientes ou non dans le système MexAB-OprM en fonction de la CMI de la novobiocine.	158
Figure 34. Distribution des phénotypes TicHS, TicHS/M, MexAB ⁺ et MexAB ⁺ /AmpC ⁺⁺ parmi les 36 patients analysés.	160
Figure 35. Distribution en pourcentage des phénotypes TicHS, TicHS/M et MexAB ⁺ en fonction de l'âge des patients.	161
Figure 36. Cinétique de l'activité hémolytique thermostable pour le couple PAO1/PAO1mexB::FRT (a). Cinétique de production de l'élastase pour le couple PA14/PA14mexB::FRT.	165
Figure 37. Cytotoxicité de la souche PAO1 et de son mutant dérivé surproduisant MexAB-OprM (MexAB ⁺⁺) et celui inactivé dans le système (PAO1mexB::FRT).	166
Figure 38. Dénombrement des populations WT et TicHS après 24 heures de co-culture pour les couples PAO1/PAO1mexB::FRT (a) et 3525/3807 (b).	167
Figure 39. Localisation des mutations identifiées chez les mutants agrW2 sur une représentation schématique du système à deux composants ParRS.	173
Figure 40. Détermination de la CMI par E-test [®] .	185
Figure 41. Mise en évidence de la production de rhamnolipides.	186
Figure 42. Mise en évidence de l'activité hémolytique.	187
Figure 43. Mise en évidence de l'activité des protéases.	188
Figure 44. Mise en évidence de la production de pyocyanine.	188

<i>Figure 45. Mise en évidence de la production de pyoverdine.</i>	189
<i>Figure 46. Mise en évidence de la mobilité par swarming.</i>	189
<i>Figure 47. Mise en évidence de la mobilité de type twitching.</i>	190
<i>Figure 48. Mise en évidence de l'activité combinée des rhamnolipides, des pili et du flagelle.</i>	190
<i>Figure 49. Activité hémolytique de la souche sauvage PT5 et du mutant PT712 (rhlA::gm) au cours de la croissance.</i>	191
<i>Figure 50. Disposition et identification des sondes et témoins positifs (biotine) greffés sur la puce « P. aeruginosa ».</i>	202
<i>Figure 51. Exemple d'amplification du locus 215 chez les souches de P. aeruginosa PAO1 et PA14.</i>	203

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1. Principaux systèmes d'efflux impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez quelques espèces de bacilles à Gram négatif d'intérêt médical.</i>	34
<i>Tableau 2. Part relative des différents bacilles non fermentaires dans les infections nosocomiales en France, 2012.</i>	41
<i>Tableau 3. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de Acinetobacter.</i>	43
<i>Tableau 4. Contribution des systèmes d'efflux AdeABC, AdeIJK et AdeFGH à la résistance acquise de A. baumannii.</i>	45
<i>Tableau 5. Conséquences de l'inactivation des différents systèmes d'efflux de Acinetobacter sur la résistance de souches cliniques MDR.</i>	49
<i>Tableau 6. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de A. xylosoxidans.</i>	51
<i>Tableau 7. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches cliniques de A. xylosoxidans.</i>	52
<i>Tableau 8. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de Burkholderia.</i>	54
<i>Tableau 9. Conséquence de l'inactivation des différents systèmes d'efflux de Burkholderia sur la résistance de souches sauvages.</i>	57
<i>Tableau 10. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de S. maltophilia.</i>	61
<i>Tableau 11. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance naturelle des souches de S. maltophilia.</i>	63
<i>Tableau 12. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance acquise des souches de S. maltophilia.</i>	65
<i>Tableau 13. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de P. putida.</i>	68
<i>Tableau 14. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance naturelle de P. putida.</i>	69
<i>Tableau 15. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance de P. aeruginosa.</i>	71
<i>Tableau 16. Contribution des systèmes MexAB-OprM et MexXY/OprM à la résistance naturelle de P. aeruginosa.</i>	76
<i>Tableau 17. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance acquise de P. aeruginosa.</i>	78
<i>Tableau 18. Analyse de l'expression des gènes connus pour être activés lorsque la sous-unité 23S du ribosome est altérée et phénotype de croissance des souches cliniques agrW1.</i>	148

<i>Tableau 19. Tableau récapitulatif des mutations retrouvées dans les gènes mexA et mexB chez les souches TicHS sélectionnées.</i>	<i>154</i>
<i>Tableau 20. Profils de résistance de mutants mexB::FRT et de souches cliniques TicHS présentant des mutations dans les gènes mexA ou mexB.</i>	<i>157</i>
<i>Tableau 21. Etude de la production ou de l'activité de différents facteurs de virulence.</i>	<i>164</i>
<i>Tableau 22. Sensibilité aux antibiotiques de l'isolat 2508 et des 4 isolats génétiquement identiques.</i>	<i>175</i>
<i>Tableau 23. Liste des souches utilisées.</i>	<i>181</i>
<i>Tableau 24. Liste des plasmides utilisés.</i>	<i>182</i>
<i>Tableau 25. Liste des amorces utilisées.</i>	<i>193</i>
<i>Tableau 26. Couples d'amorces utilisés pour le génotypage par MLVA.</i>	<i>204</i>
<i>Tableau 27. Abréviations utilisées pour les antibiotiques.</i>	<i>207</i>

Table des matières

INTRODUCTION	11
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
A. Structure générale et fonctionnement des pompes d'efflux actif	23
1. Définition	23
2. Familles de transporteurs et modes d'énergisation	23
2.1. Les transporteurs de la famille ABC	24
2.2. Les transporteurs de la famille RND	26
2.3. Les transporteurs de la famille MFS	28
2.4. Les transporteurs de la famille SMR	29
2.5. Les transporteurs de la famille MATE	31
B. Contribution des systèmes d'efflux intrinsèques à la résistance aux antibiotiques chez les Gram négatifs	33
1. Les principaux systèmes et leurs substrats antibiotiques	33
2. Contribution des pompes à la résistance des principaux BGN-NF	41
2.1. <i>Acinetobacter</i>	41
2.2. <i>Achromobacter</i>	50
2.3. <i>Burkholderia</i>	52
2.4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	59
2.5. <i>Pseudomonas putida</i>	67
2.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
RÉSULTATS	95
A. Article 1	97
1. Présentation de l'étude	98
2. Résultats	98
3. Conclusion	99
4. Texte de l'article	99

B. Article 2	105
1. Présentation de l'étude	106
2. Résultats	106
3. Conclusion	107
4. Texte de l'article	107
5. Résultats complémentaires à l'article 2	145
5.1. Altération de l'ARN 23S et génotype <i>agrWI</i>	145
5.2. Contribution de MexXY et OprM à la résistance de haut niveau aux aminosides chez les souches cliniques	148
C. Autres travaux	151
1. Contexte de l'étude	152
2. Résultats	153
2.1. Caractérisation des souches sélectionnées	153
2.2. Prévalence des souches déficientes dans le système MexAB-OprM	155
2.3. Distribution du phénotype TicHS intra-patients	159
2.4. Distribution des souches en fonction de l'âge des patients	161
2.5. Etude de la virulence	161
2.6. Etude du fitness	167
CONCLUSION-PERSPECTIVES	169
MATÉRIEL ET MÉTHODES	179
A. Techniques microbiologiques	181
1. Souches bactériennes et plasmides utilisés	181
2. Milieux de culture	183
3. Mesure de la croissance bactérienne	184
4. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	184
4.1. Antibiotogrammes	184
4.2. Détermination de la CMI en milieu gélosé	184
4.3. Détermination de la CMI de la colistine en milieu liquide	184

4.4.	Détermination de la CMI du sulfaméthoxazole par E-test®	185
5.	Etude de l'activité perméabilisante membranaire des aminosides	185
5.1.	Préparation des échantillons	185
5.2.	Mesure de la fluorescence	186
6.	Evaluation de la virulence	186
6.1.	Mesures en « end-point »	186
6.2.	Mesures en cinétique	190
7.	Expériences de compétition	191
B.	Techniques de biologie moléculaire	192
1.	Extraction d'acides nucléiques	192
1.1.	Extraction d'ADN génomique	192
1.2.	Extraction d'ADN plasmidique	192
2.	Amplification d'ADN par PCR	192
3.	Electrophorèse en gel d'agarose	196
4.	Purification des fragments d'ADN	197
5.	Séquençage de l'ADN	197
6.	Techniques de clonage	197
6.1.	Hydrolyse de l'ADN par les endonucléases de restriction	197
6.2.	Ligature des fragments d'ADN	197
7.	Transformation bactérienne	198
7.1.	Transformation par choc thermique de cellules de E. coli rendues compétentes par le chlorure de rubidium	198
7.2.	Conjugaison bactérienne	198
8.	Délétion génique par PCR chevauchante et recombinaison homologue	199
9.	Complémentation chromosomique	199
10.	Quantification des ARNm par PCR en temps réel	200
10.1.	Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc	200
10.2.	Amplification des ADNc	200

10.3. Quantification relative des transcrits des gènes	201
11. Recherche d'un gène « <i>oprM</i> like »	201
C. Génotypage	202
1. Puces à ADN	202
2. MLVA	203
Annexe	205
Références	209

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie environnementale à l'origine d'environ 10% des infections nosocomiales en France (<http://www.invs.sante.fr>), comme en Europe (Zarb P *et al.*, 2012). Ce bacille à Gram négatif dont le génome compte parmi les plus grands jamais séquencés chez les espèces pathogènes de l'homme (de 5,2 à 7 Mpb) est devenu un modèle d'étude, tant sur le plan physiologique que génétique ou génomique au même titre que *Escherichia coli*. Sa versatilité nutritionnelle et métabolique importante, sa résistance naturelle à de nombreux inhibiteurs et sa capacité à produire tout un arsenal de facteurs de virulence, ont permis au bacille pyocyanique de s'imposer en tant que pathogène opportuniste majeur dans le milieu hospitalier malgré l'utilisation massive d'agents antibactériens. Cette bactérie est ainsi à l'origine d'infections aiguës ou chroniques, notamment chez les sujets immunodéprimés ou ceux atteints de mucoviscidose (CF).

L'élément-clé de son succès est une résistance naturelle aux antibiotiques et aux antiseptiques nettement supérieure à celle de la plupart des autres espèces microbiennes, qu'elles soient environnementales ou commensales. Cette propriété s'explique par l'existence chez cette bactérie de plusieurs mécanismes aux actions complémentaires ou synergique, dont le déterminisme est codé par le génome de l'espèce. Ainsi, la membrane externe, véritable barrière de perméabilité, joue un rôle essentiel dans la pénétration et l'efficacité des antibiotiques, favorisant l'action d'enzymes péripasmiques (céphalosporinase AmpC) ou intracytoplasmique (enzyme modificateur APM(3')-IIB) capables d'inactiver certains antibiotiques de la famille des β -lactamines (ticarcilline, pipéracilline ou ceftazidime) et des aminosides (kanamycine, néomycine) respectivement. Enfin la production de systèmes d'efflux actif polyspécifiques (MexAB-OprM et MexXY/OprM) permet à la bactérie de rejeter activement de nombreux substrats, dont les antibiotiques, dans le milieu extracellulaire. Toutefois, l'acquisition d'éléments génétiques mobiles provenant de divers réservoirs microbiens, l'altération des cibles cellulaires des antibiotiques, la surproduction d'enzymes inactivatrices ou de systèmes d'efflux permettent à ce micro-organisme d'atteindre des niveaux de résistance encore plus élevés.

L'analyse du génome de la souche de référence PAO1 a conduit à l'identification de nombreux systèmes d'efflux dont 12 pompes appartenant à la famille RND (*Resistance Nodulation cell Division*). MexXY/OprM et MexAB-OprM ont été plus particulièrement étudiées ; aussi les connaissances concernant la structure de ces systèmes, la nature des substrats transportés ainsi que les mécanismes de régulation sont elles plus avancées que pour d'autres pompes.

Trois types de mutants surproduisant le système MexXY/OprM ont été caractérisés. Les premiers, baptisés *agrZ* (*aminoglycoside resistance MexZ-dependent*), présentent des altérations dans le gène *mexZ* dont le produit, la protéine MexZ, réprime à l'état sauvage l'expression de l'opéron *mexXY*. Les seconds, nommés *agrW1* sont l'objet de mutations perturbant la synthèse protéique et conduisant à la surexpression du gène *PA5471*, dont le produit est capable de se fixer à la protéine MexZ compromettant la liaison de cette dernière à l'ADN et son rôle de répresseur. Enfin, les mutants de type *agrW2* sont affectés dans les gènes codant un système membranaire à deux composants appelé ParRS. Les loci génétiques à l'origine de la surproduction du système MexXY/OprM chez les mutants *agrW1* et *agrW2* ayant été récemment identifiés, leur prévalence n'a jamais été à ce jour évaluée. C'est pourquoi, nous nous sommes attachés, au cours de ce travail de thèse, à caractériser les mécanismes génétiques conduisant à la surproduction du système MexXY-OprM parmi une collection de souches cliniques.

Si certaines populations de *P. aeruginosa* tendent à devenir plus résistantes aux aminosides en surproduisant la pompe MexXY/OprM, d'autres évoluent paradoxalement vers une hypersensibilité aux β -lactamines notamment sous l'effet de mutations délétères dans les gènes codant le système MexAB-OprM. Ainsi, l'analyse régulière des isolats présents dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose (CF) a révélé l'existence de bactéries beaucoup plus sensibles à la ticarcilline ($\text{CMI} \leq 4 \text{ mg/L}$) que la souche de référence PAO1 ($\text{CMI} = 16 \text{ mg/L}$). Ce phénotype particulier, nommé TicHS, dont la prévalence serait proche de 30%, coloniserait un patient sur deux (thèse Lucie Vettoretti). Dans une seconde partie, nous nous sommes attachés à mieux caractériser cette population mal connue en évaluant plus précisément sa prévalence au sein d'une large collection de souches cliniques CF produisant parfois des mécanismes supplémentaires tels que la céphalosporinase naturelle AmpC.

La partie bibliographique de ce manuscrit a pour objectif de faire le point sur l'implication des systèmes d'efflux dans la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif à travers l'exemple de quelques bacilles non fermentaires d'intérêt clinique. Les secondes et troisièmes parties sont consacrées à la présentation des résultats obtenus au cours de notre travail de thèse, leur discussion et les perspectives offertes. Les méthodes utilisées sont, quant à elles, regroupées dans la dernière partie du document.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Structure générale et fonctionnement des pompes d'efflux actif

1. Définition

La découverte de la résistance par efflux date de 1963 lorsque deux scientifiques japonais observèrent qu'une souche de *E. coli* multi-résistante accumulait moins d'oxytétracycline au niveau intracellulaire qu'une souche sensible (Izaki and Arima, 1963). En 1980, Stuart B. Levy démontra que ce phénomène résultait d'un mécanisme actif (McMurry *et al.*, 1980). Médié par des transporteurs membranaires appelés « pompes d'efflux », il se traduit par le rejet de diverses substances hors de la cellule bactérienne sans altération ou dégradation du composé. Largement représentées dans le monde vivant, ces nanomachines moléculaires ont pour fonction de maintenir l'homéostasie cellulaire en s'opposant à la pénétration de produits toxiques tels que des métaux lourds et divers inhibiteurs (antibiotiques, sels biliaires, acides gras, hormones, molécules de défense d'organismes supérieurs...) (Piddock, 2006). Chez les bactéries, la résistance aux antibiotiques n'est donc qu'un des aspects de la fonction des systèmes d'efflux.

A l'origine de bas niveaux de résistance, les pompes d'efflux peuvent cependant contribuer à l'émergence de souches bactériennes multi-résistantes difficiles à éradiquer en s'associant notamment à d'autres mécanismes (German *et al.*, 2008).

2. Familles de transporteurs et modes d'énergisation

Qu'ils soient composés d'une (essentiellement chez les bactéries à Gram positif) ou de trois protéines (exclusivement chez les Gram négatifs), les systèmes d'efflux possèdent tous un élément commun et essentiel. Cette protéine ou « pompe » insérée dans l'épaisseur de la membrane cytoplasmique assure la reconnaissance, la fixation et le transport de substrats spécifiques. Constitués de 4, 12 ou 14 segments peptidiques hydrophobes transmembranaires reliés entre eux par des boucles hydrophiles extra-membranaires, ces transporteurs ont été classés en 5 familles sur la base de leur structure primaire : **ABC** (*ATP-Binding Cassette*) ; **RND** (*Resistance Nodulation cell Division*) ; **MFS** (*Major Facilitator Superfamily*) ; **SMR** (*Small Multidrug Resistance*) et **MATE** (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*).

En fonction de l'énergie requise pour le transport, on distingue les transporteurs primaires qui utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (protéines ABC) et les

transporteurs secondaires qui tirent parti du gradient électrochimique membranaire, la sortie du substrat étant alors couplée à l'entrée de protons dans la cellule (protéines RND, MFS, MATE et SMR) ou d'ions Na^+ (protéines MATE) (**Figure 1**).

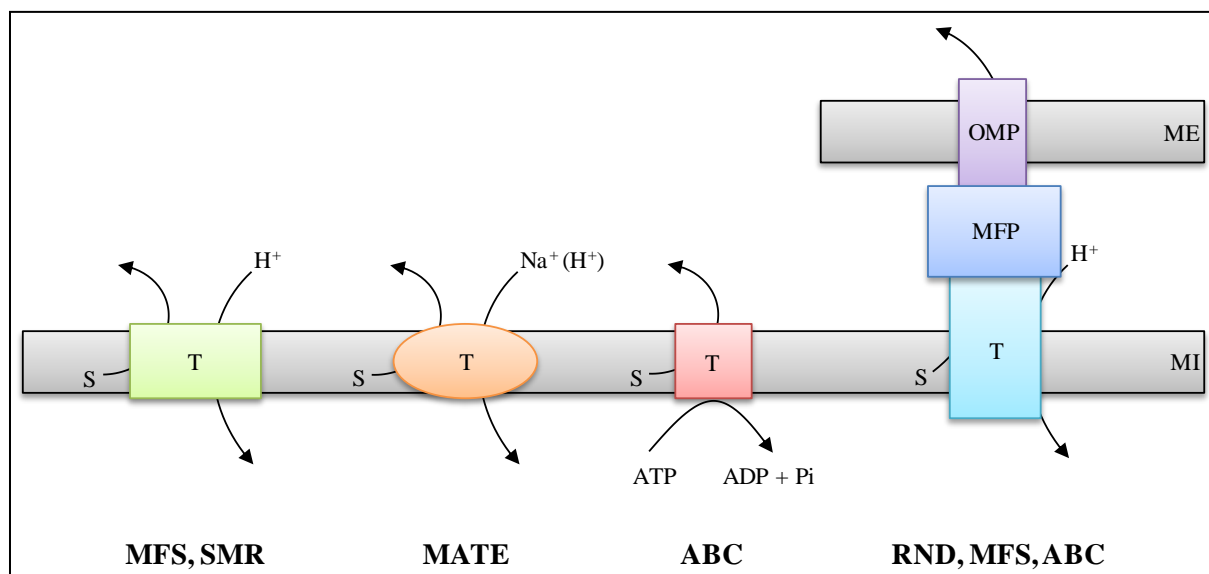


Figure 1. Représentation schématique des 5 familles de transporteurs.

MFS : Major Facilitator Superfamily. SMR: Small Multidrug Resistance. MATE : Multidrug And Toxic compound Extrusion. ABC : ATP-Binding Cassette. RND : Resistance Nodulation cell Division. S: Substrat. T : Transporteur. ME : Membrane Externe. MI : Membrane Interne. MFP : Membrane Fusion Protein. OMP : Outer Membrane Protein. Les familles MFS, SMR, MATE et ABC sont retrouvées aussi bien chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif. Les transporteurs RND sont spécifiques des Gram négatifs.

2.1. Les transporteurs de la famille ABC

Les transporteurs ABC sont largement représentés chez les eucaryotes comme chez les procaryotes (Lubelski *et al.*, 2007). Chez ces derniers, ils sont impliqués dans l'import de nutriments et l'export de molécules toxiques alors que chez les eucaryotes, seule la fonction d'efflux a été décrite à ce jour (Chang, 2003) (Higgins, 2001).

La structure canonique d'un transporteur ABC est composée de quatre domaines : deux domaines hydrophobes transmembranaires impliqués dans la reconnaissance et le transport du substrat (TMD : *TransMembrane Domain*) et deux domaines cytoplasmiques liant et hydrolysant l'ATP (NBD : *Nucleotide-Binding Domain*) (Lubelski *et al.*, 2007). Chez les eucaryotes, ces domaines sont en général fusionnés dans un long polypeptide, alors que chez la majorité des procaryotes, ils sont portés par des peptides différents.

Les TMD sont habituellement composés de 6 hélices α par domaine (Sav 1866) mais parfois 10 comme dans le transporteur BtuCD de *Escherichia coli* (**Figure 2**). Les domaines NBD de tous les membres de la famille ABC comportent, quant à eux, 3 motifs conservés

caractéristiques, à savoir, les motifs Walker A et B, courtes séquences d'acides aminés fixant l'ATP et le motif « LSGGQ ».

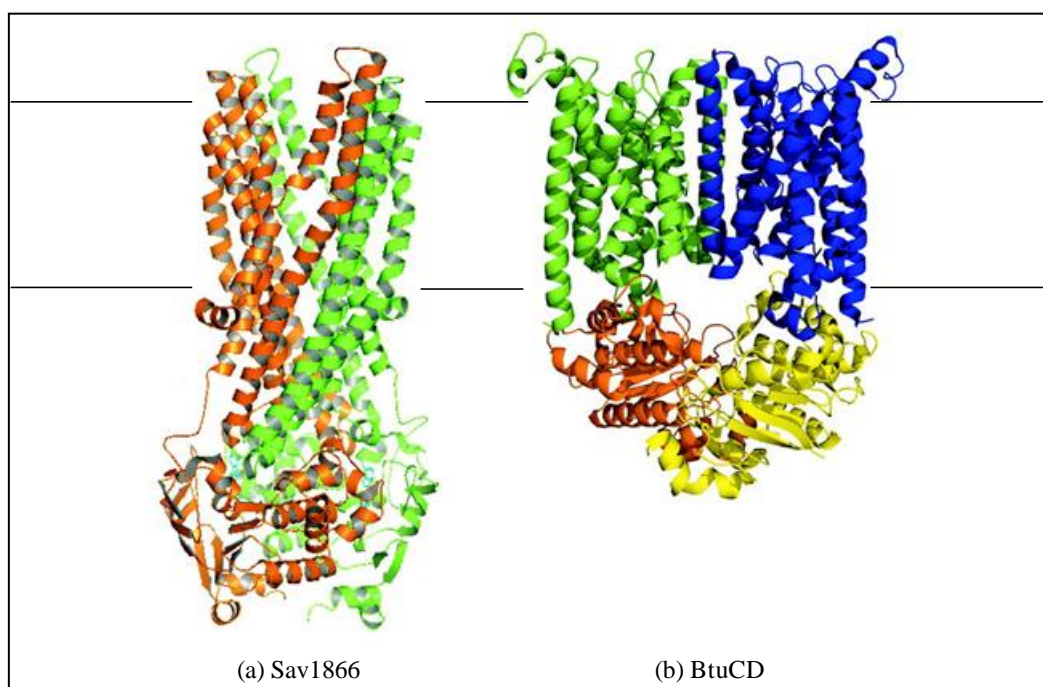


Figure 2. Structure des transporteurs eucaryotes de type ABC.

(a) Sav1866, transporteur homodimérique de *Staphylococcus aureus* composé de 2 sous-unités représentées en rouge et en vert. (b) BtuCD, transporteur de la vitamine B12 de *E. coli* comprenant 4 sous-unités distinctes. D'après (Lubelski *et al.*, 2007).

La résolution de la structure 3D de plusieurs de ces systèmes a permis de préciser le mécanisme du transport (Linton, 2007) (**Figure 3**). Quatre étapes ou changements conformationnels sont couplés à (i) la liaison du ligand, (ii) la fixation de l'ATP, (iii) l'hydrolyse de l'ATP et (iv) la libération d'ADP et de Pi. La conformation « apo » du transporteur correspond à un état de forte affinité pour le ligand dont la fixation entraîne secondairement une augmentation d'affinité des domaines NBD pour l'ATP. La liaison du nucléotide induit la fermeture de ces domaines, avec réarrangement des domaines transmembranaires qui basculent dans une conformation de faible affinité pour le ligand, ouverte vers l'extérieur. Le changement de conformation des domaines NBD s'accompagne également de l'hydrolyse du nucléotide ; le relargage d'ADP et de Pi rétablit la conformation « apo » initiale.

Chez les Gram négatifs, certains transporteurs ABC interagissent avec une protéine de membrane externe (OMP : *Outer Membrane Protein*) et une protéine adaptatrice périplasmique (MFP : *Membrane Fusion Protein*) pour permettre aux substrats de franchir la

membrane externe et d'être libérés dans le milieu extracellulaire tels que MacAB-TolC de *E. coli*.

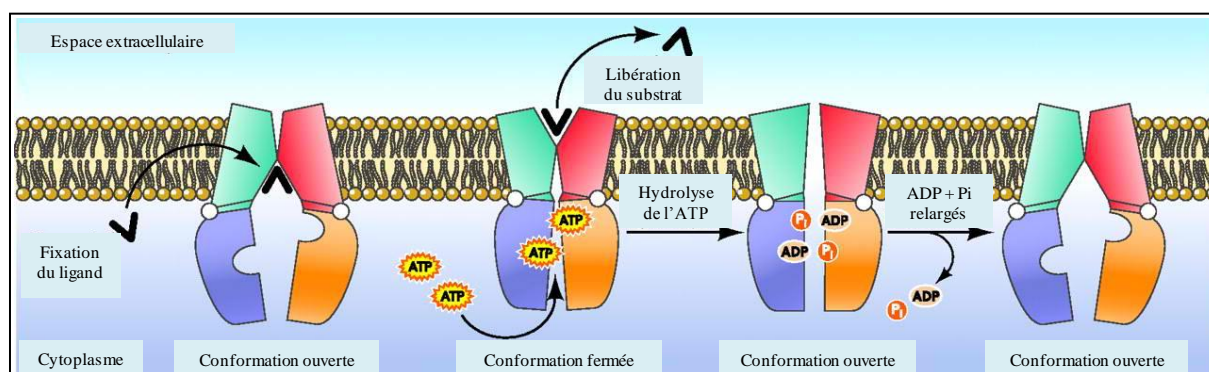


Figure 3. Mécanisme de transport des systèmes ABC.
D'après (Linton, 2007).

2.2. Les transporteurs de la famille RND

Ces transporteurs ubiquitaires sont regroupés en 7 familles, au moins, en fonction de leur spécificité de substrats (Tseng *et al.*, 1999). Essentiellement retrouvés chez les bactéries à Gram négatif, les membres de la famille HAE1 (*Hydrophobic/Amphiphilic Efflux-1*) sont capables de reconnaître et exporter un large spectre de molécules lipophiles ou amphiphiles incluant des détergents, des colorants, des antiseptiques et des antibiotiques (Tseng *et al.*, 1999). Dans leur état fonctionnel, ces transporteurs forment des assemblages multimériques traversant à la fois la membrane interne, le périplasma et la membrane externe (Zgurskaya, 2002). Ainsi, le transporteur enchâssé dans la membrane interne s'associe avec une protéine de membrane externe et une protéine périplasmique qui consolide l'édifice (**Figure 4a**).

La résolution de la structure des protéines AcrB (*E. coli*) et MexB (*P. aeruginosa*) par cristallographie aux rayons X a permis de mieux comprendre le fonctionnement de ces systèmes d'efflux (Murakami *et al.*, 2002) (Sennhauser *et al.*, 2009). Comme le transporteur AcrB, MexB est organisé en une structure trimérique où chaque monomère (environ 1000 acides aminés) se compose de 12 segments transmembranaires (TMS) ainsi que d'un domaine périplasmique formé de 2 boucles localisées entre, d'une part les TMS1 et TMS2 et, d'autre part les TMS7 et TMS8. Ces domaines périplasmiques se replient en 6 sous-domaines dont 4 forment le domaine « pore » et les 2 derniers, le domaine d'ancrage à la protéine de membrane externe (Sennhauser *et al.*, 2009) (**Figure 4b**).

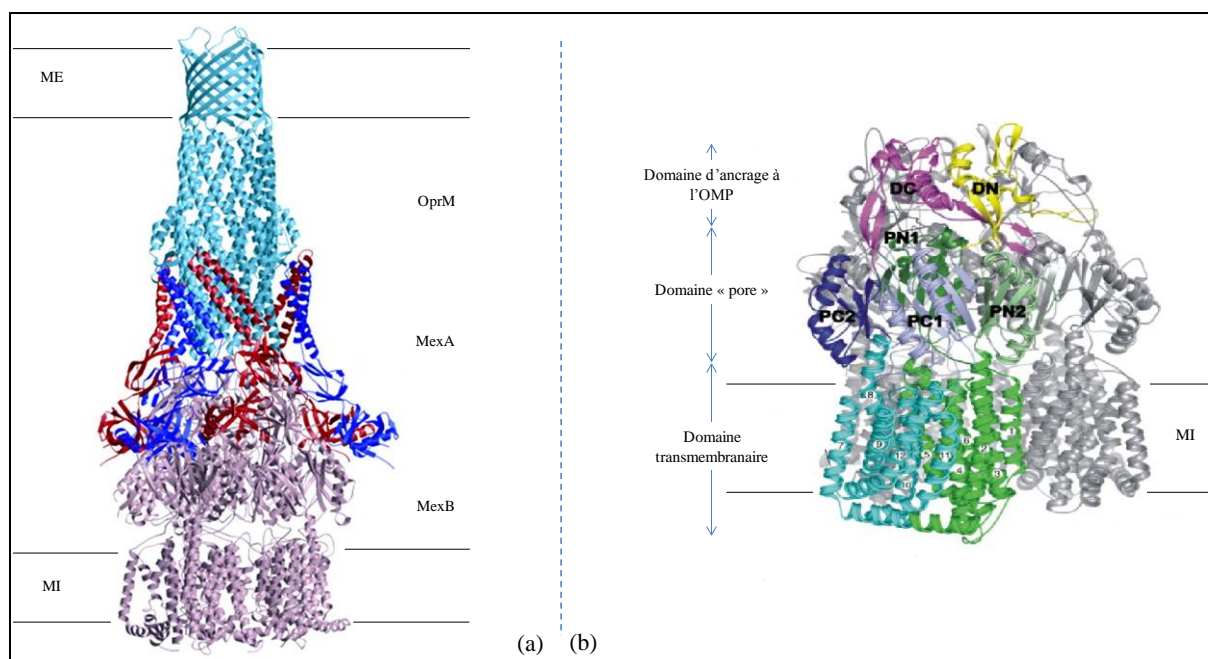


Figure 4. Structure tripartite du système d'efflux MexAB-OprM (a) et structure cristallographique du transporteur MexB (b) (*P. aeruginosa*).

(a) Structure assemblée des protéines MexA (trimère), MexB (trimère) et OprM (trimère). ME : Membrane Externe. MI : Membrane Interne. D'après (Akama *et al.*, 2004) (Pos, 2009b). (b) Sur cette structure sont représentés les 3 principaux domaines d'un monomère de la protéine MexB. OMP : Outer Membrane Protein. D'après (Sennhauser *et al.*, 2009).

L'analyse des structures cristallographiques du transporteur AcrB en présence de différents ligands, analogues d'antibiotiques pour la plupart, a permis la mise en évidence de trois cavités : (i) la cavité périplasmique, particulièrement riche en acides aminés aromatiques, localisée au niveau du domaine « pore » de chaque monomère, (ii) la cavité centrale, à l'interface des domaines transmembranaires des monomères et (iii) le pore central formé par le trimère au niveau du domaine d'ancrage à la protéine de membrane externe (Yu *et al.*, 2005) (Sennhauser *et al.*, 2009).

Les substrats accèdent à la cavité périplasmique par des vestibules latéraux et sont finalement acheminés vers le pore central puis le tunnel de la protéine OMP afin d'être exportés hors de la cellule. L'asymétrie observée au niveau des trimères formant cette structure (Seeger *et al.*, 2006), a permis de proposer un modèle d'efflux cyclique où chaque monomère prend alternativement trois conformations différentes : une conformation dite relâchée (L) dans laquelle l'entrée du vestibule périplasmique est ouverte aux substrats, une conformation dite resserrée (T) où le substrat se fixe dans la cavité périplasmique et une conformation dite ouverte (O) où la cavité périplasmique s'ouvre en direction du pore central pour permettre l'acheminement du substrat vers le canal formé par la protéine de membrane externe (Sennhauser *et al.*, 2009) (**Figure 5**). Ces changements (L→T→O) sont initiés par

l'influx d'un proton qui interagit avec des résidus aspartate situés au centre du domaine transmembranaire.

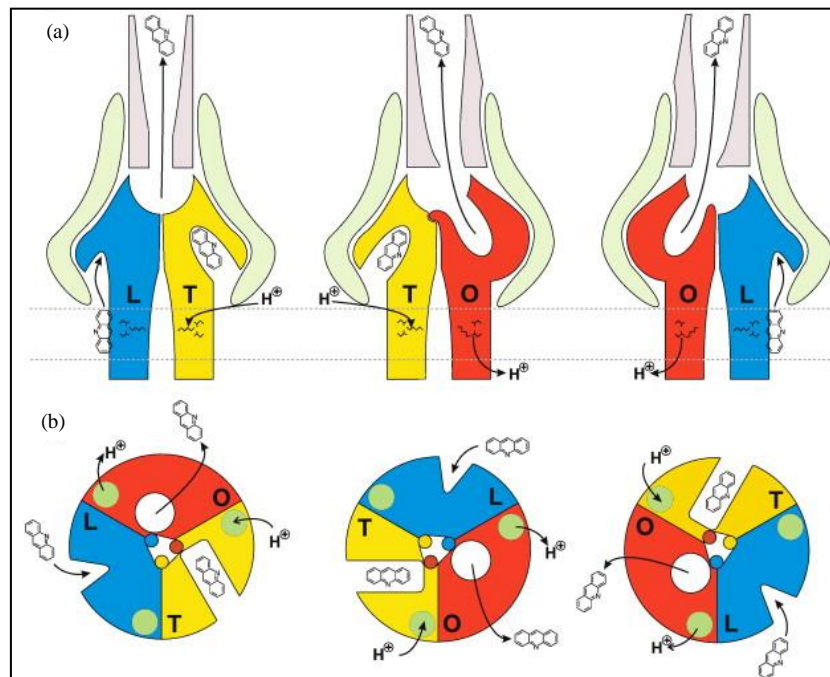


Figure 5. Représentation schématique du système de transport de AcrB (*E. coli*).

(a) Vue latérale. Les conformations dites relâchée (L), resserrée (T) et ouverte (O) sont représentées respectivement en bleu, jaune et rouge. Sur le schéma, seuls deux des 3 monomères sont représentés. AcrA et TolC sont représentées en vert clair et rose clair respectivement. (b) Les sillons latéraux présents au niveau des monomères L et T indiquent les sites de liaison du substrat. Les différentes formes géométriques représentent une faible (triangle), une forte (rectangle) ou aucune (cercle) affinité pour le substrat transporté. D'après (Pos, 2009a).

2.3. Les transporteurs de la famille MFS

Ce sont des protéines d'environ 400 acides aminés retrouvées aussi bien chez les bactéries que chez les eucaryotes. L'analyse de leurs profils d'hydrophobicité et l'alignement de leurs séquences ont permis de les regrouper en 2 sous-familles : les pompes à 12 (12 TMS) et à 14 segments transmembranaires (14 TMS) (Paulsen *et al.*, 1996) (Putman *et al.*, 2000).

Ces transporteurs fonctionnent généralement de façon autonome sans autre partenaire, excepté chez quelques bactéries à Gram négatif où ils requièrent la présence d'une lipoprotéine adaptatrice et d'une protéine de membrane externe (Zgurskaya, 2002). Le mécanisme de transport des substrats a été particulièrement étudié chez *E. coli* avec le système MdfA (**Figure 6**). Comme le montre la **Figure 7**, deux acides aminés sont essentiels au transport (E26 et D34) (Sigal *et al.*, 2009; Fluman *et al.*, 2012). La première étape du processus consiste en la libération d'un proton de D34 dans le cytoplasme *via* E26, rendant

possible la liaison d'une molécule de substrat à MdfA sur un site distinct de D34. La fixation du substrat engendre un changement conformationnel de la protéine qui s'ouvre en direction du périplasma. Une fois le substrat libéré dans l'espace périplasmique, un proton vient se lier au résidu D34 entraînant un retour du transporteur à sa conformation initiale.

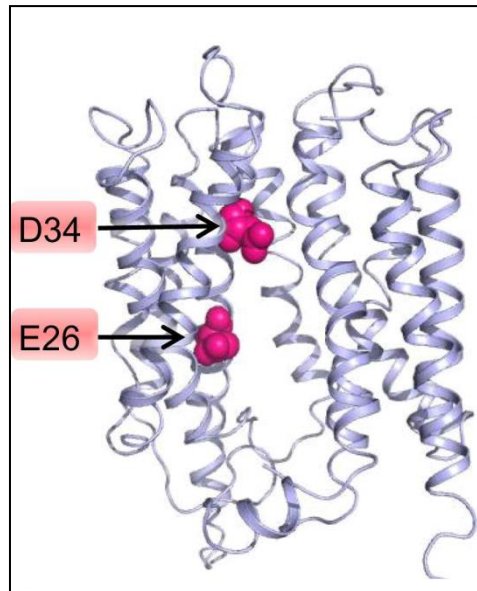


Figure 6. Structure 3D de la protéine MdfA (12TMS) (*E. coli*).

Pour plus de clarté, le 11^{ème} segment transmembranaire n'est pas représenté. Les acides aminés D34 et E26 nécessaires au transport sont représentés en rose. D'après (Fluman *et al.*, 2012).

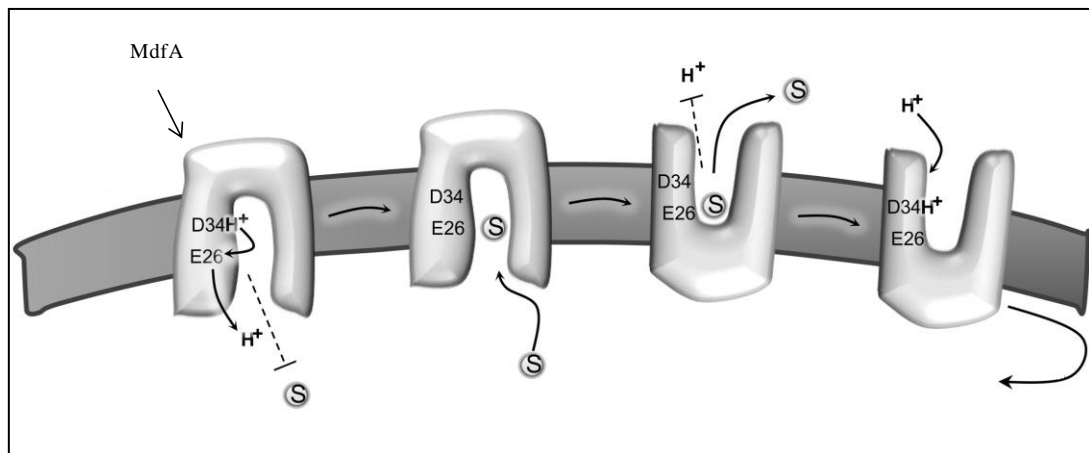


Figure 7. Mécanisme de transport de MdfA (*E. coli*).

S : Substrat. D'après (Fluman *et al.*, 2012).

2.4. Les transporteurs de la famille SMR

Présentes chez les procaryotes uniquement, ces protéines de petite taille (environ 110 acides aminés) comprennent 4 hélices transmembranaires. Plusieurs monomères sont

supposés s'associer pour former une structure fonctionnelle capable de prendre en charge des substrats (Ubarretxena-Belandia and Tate, 2004). L'analyse cristallographique du transporteur EmrE de *E. coli* a mis en évidence une organisation sous forme d'homodimère asymétrique capable d'exporter des composés aromatiques chargés positivement en échange de deux protons (**Figure 8**).

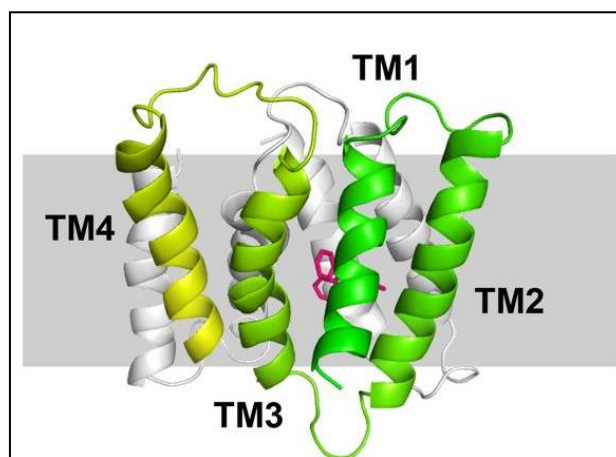


Figure 8. Structure du transporteur EmrE de *E. coli* lié au tétraphényl phosphonium (en rose). Un monomère est représenté en vert et l'autre en gris. TM : segment TransMembranaire. D'après (Chen *et al.*, 2007).

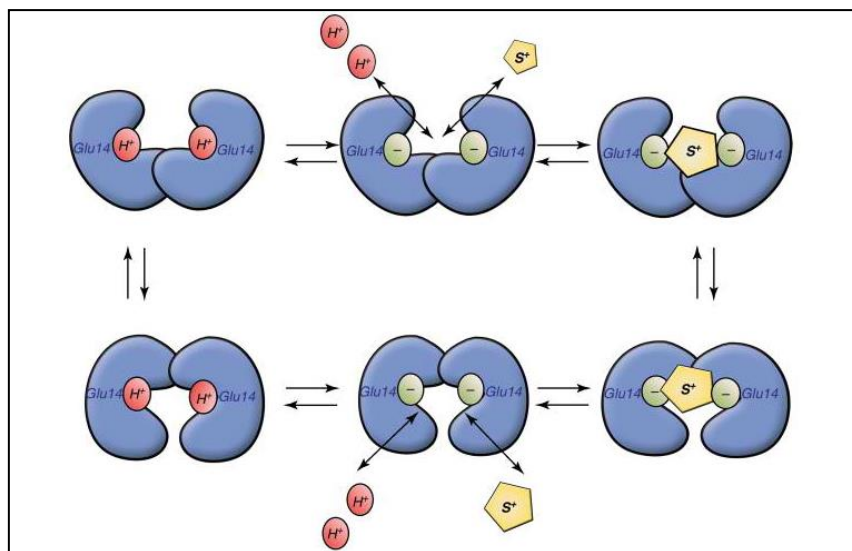


Figure 9. Mécanisme de transport du système EmrE de *E. coli*. S⁺ : Substrat chargé positivement. D'après (Schuldiner, 2012).

Le mécanisme de transport présumé est représenté par la **Figure 9** (Schuldiner, 2012). Les segments transmembranaires 1 et 3 de chaque monomère créent une poche permettant la fixation du ligand sur un site qui se charge négativement par la libération de 2 protons. L'interaction avec le substrat entraîne alors un changement conformationnel du transporteur

dont la poche s'ouvre en direction du périplasma. La reprotonation des résidus Glu libère le substrat et permet la réorientation du site de liaison du côté opposé.

2.5. Les transporteurs de la famille MATE

Initialement classées dans la famille MFS, les protéines de la famille MATE sont maintenant reconnues comme appartenant à une famille spécifique. Malgré une structure 3D très similaire, elles ne présentent aucune identité de séquence avec les protéines MFS. Composés d'environ 450 acides aminés, les transporteurs MATE forment des structures à 12 segments transmembranaires (Kumar and Schweizer, 2005). Bien que la plupart utilise un gradient de sodium comme source d'énergie, certains d'entre eux tels que PmpM de *P. aeruginosa* et AbeM de *A. baumannii* fonctionnent avec la force proton motrice (He *et al.*, 2004) (Begum *et al.*, 2005).

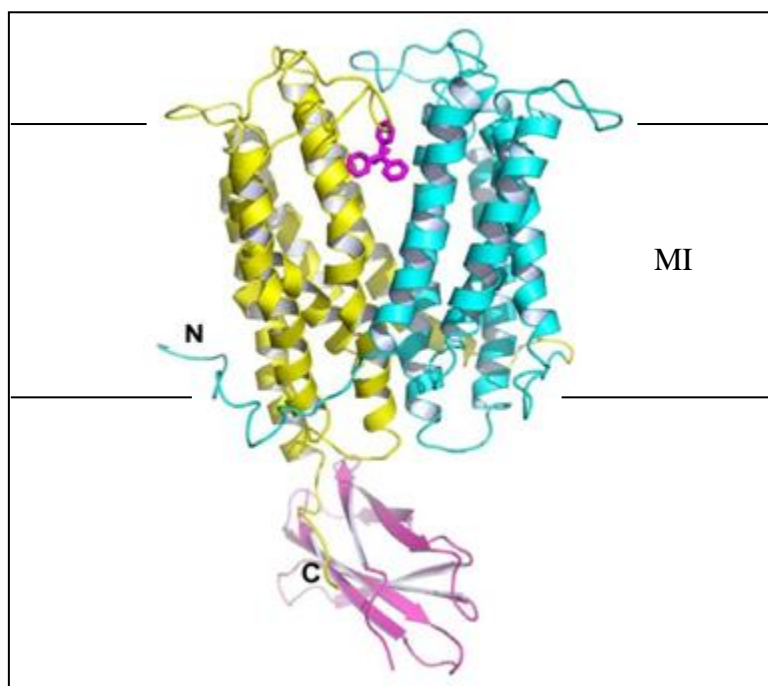


Figure 10. Structure du transporteur NorM (*N. gonorrhoeae*) lié à l'anticorps utilisé pour la cristallisation (hélices rose clair) et au tétraphényl phosphonium (structures en rose foncé).

MI : Membrane Interne. D'après (Lu *et al.*, 2013).

La résolution récente de la structure du transporteur NorM de *Neisseria gonorrhoeae* (**Figure 10**) par cristallographie aux rayons X en complexe avec trois substrats différents (bromure d'éthidium, rhodamine 6G et tétraphényl phosphonium) a permis de proposer un mécanisme de fonctionnement pour cet antiporteur (**Figure 11**) (Lu *et al.*, 2013). La première

étape (1) correspond à la liaison d'un ion Na^+ impliquant les résidus E261 (TMS 7) et Y294 (TMS 8). Cette liaison provoque alors le mouvement des TMS 7 et TMS 8 vers le TMS 10 engageant alors l'acide aminé D377 dans l'interaction (flèche rouge) et le relargage d'une molécule de substrat (2). Le transporteur lié au cation mais désolidarisé de son substrat (3) adopte alors une conformation tournée vers le cytoplasme (4) avant de se fixer avec une nouvelle molécule de substrat. La liaison de ce composé déclenche alors le mouvement des TMS 7 et TMS 8 (flèche rouge) fragilisant ainsi la liaison du Na^+ (5). L'ion est alors libéré dans le cytoplasme (6) et le transporteur lié au substrat reprend une conformation tournée vers le milieu extérieur (1).

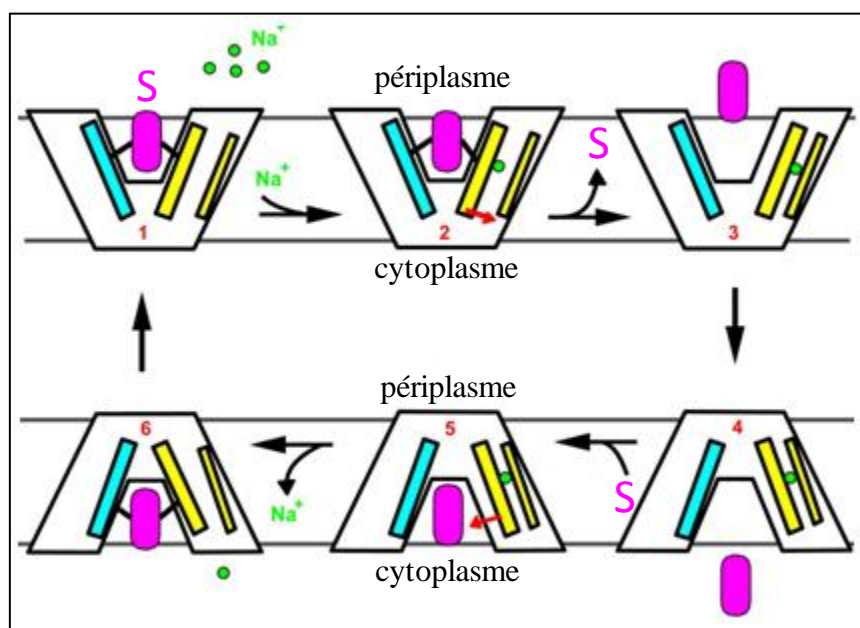


Figure 11. Mécanisme présumé de fonctionnement de l'antiporteur MATE NorM (*N. gonorrhoeae*).

Les segments transmembranaires 1 et 2 sont représentés par un bâtonnet bleu, les segments transmembranaires 7 et 8 par un bâtonnet épais jaune et le segment transmembranaire 10 par un bâtonnet fin jaune. D'après (Lu *et al.*, 2013).

B. Contribution des systèmes d'efflux intrinsèques à la résistance aux antibiotiques chez les Gram négatifs

1. Les principaux systèmes et leurs substrats antibiotiques

Comme l'illustre le **Tableau 1**, certains transporteurs et notamment ceux de type MFS, ne reconnaissent qu'un petit nombre d'agents antibactériens (par exemple, la pompe Bcr de *E. coli* ne semble « effluer » que la tétracycline). Ces systèmes ont, de ce fait, un rôle limité dans la résistance aux antibiotiques. La famille RND, au contraire, se compose essentiellement de systèmes polyspécifiques capables de conférer une résistance à des antibiotiques de structure et de classes variées (par exemple, AcrAB-TolC de *E. coli* prend en charge les β -lactamines, les macrolides, les fluoroquinolones, la tétracycline, le chloramphénicol et le triméthoprim). Ainsi, de part leur large spectre d'activité, les transporteurs RND constituent un élément-clef de la résistance chez les bactéries à Gram négatif.

Les systèmes d'efflux intrinsèques sont codés par des gènes chromosomiques dont l'expression est finement contrôlée par des régulateurs locaux et des régulateurs globaux. L'apparition de mutations dans tel ou tel gène régulateur est à l'origine de la surproduction d'une pompe donnée et d'une augmentation de la résistance aux substrats du système concerné. Les niveaux atteints, bien souvent modestes (CMI x2 à 64 fois par rapport à la souche sauvage), sont susceptibles de s'ajouter à ceux conférés par d'autres mécanismes, notamment enzymatiques, et de favoriser l'émergence de souches très difficiles à éradiquer.

Compte tenu de la diversité des nombreux systèmes d'efflux actif retrouvés chez les bacilles à Gram négatif, de la spécificité de chacun tant en termes de substrats que d'expression et d'activité, il est difficile de dresser un bilan exhaustif sur le rôle physiologique précis de ces transporteurs. Nous nous bornerons dans ces rappels bibliographiques à décrire les systèmes d'efflux ayant un rôle significatif dans la résistance naturelle et/ou acquise aux agents anti-infectieux de quelques espèces de bacilles à Gram négatif non fermentaires, en mettant l'accent sur ceux qui concourent à l'émergence de souches résistantes dans le contexte clinique.

Tableau 1. Principaux systèmes d'efflux impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez quelques espèces de bacilles à Gram négatif d'intérêt médical.

Organisme	Système d'efflux		gène(s) régulateur(s)	Substrats	Phénotype des mutants spontanés <i>in vitro</i> ^a	Caractérisation de mutants <i>in vivo</i>	Références
	Nom	Famille du transporteur					
<i>Acinetobacter</i>							
<i>A. baumannii</i>	CraA	MFS	?	CHL	nd	nd	(Coyne <i>et al.</i> , 2011) (Roca <i>et al.</i> , 2009) (Hood <i>et al.</i> , 2010)
	AmvA	MFS	?	ERY, QL	nd	oui	(Coyne <i>et al.</i> , 2011) (Rajamohan <i>et al.</i> , 2010)
	AdeABC	RND	<i>adeRS</i>	βL, AG, ML, QL, TC, CHL, TMP	FEP (8x), IPM (2x), AMK (16x), GEN (16x), TOB (16x), ERY (8x), CIP (4x), NOR (8x), MIN (2x), TET (2x), TGC (2x), CHL (≥2x)	nd	(Coyne <i>et al.</i> , 2011) (Magnet <i>et al.</i> , 2001) (Marchand <i>et al.</i> , 2004) (Coyne <i>et al.</i> , 2010a)
	AdeIJK	RND	<i>adeN</i>	βL, AMK, ML, QL, TC, CHL, RIF, TMP/SMX	ATM (2x), CAZ (4x), FEP (2x), TIC (2x), AMK (4x), ERY (4x), CIP (4x), NOR (2x), MIN (4x), TET (4x), TGC (4x), CHL (>2x), RIF (2x), TMP/SMX (2x)	nd	(Coyne <i>et al.</i> , 2011) (Damier-Piolle <i>et al.</i> , 2008) (Coyne <i>et al.</i> , 2010a)
	AdeFGH	RND	<i>adeL</i>	βL, TOB, CLI, QL, TC, CHL, RIF, TMP/SMX	IMP (2x), TIC (2x), TOB (2x), CIP (4x), NOR (8x), MIN (4x), TET (2x), TGC (4x), CHL (>2x), RIF (2x)	nd	(Coyne <i>et al.</i> , 2011) (Coyne <i>et al.</i> , 2010b) (Coyne <i>et al.</i> , 2010a)
	AbeM	MATE	?	AG, ERY, QL, CHL	nd	nd	(Coyne <i>et al.</i> , 2011) (Bratu <i>et al.</i> , 2008) (Su <i>et al.</i> , 2005)
	AbeS	SMR	?	ERY, QL, CHL	nd	nd	(Coyne <i>et al.</i> , 2011) (Srinivasan <i>et al.</i> , 2009)
<i>Achromobacter</i>							
<i>A. xylosoxidans</i>	AxyABM	RND	<i>axyR</i>	βL, QL, CHL	nd	non	(Bador <i>et al.</i> , 2011)
	AxyXY-OprZ	RND	<i>axyZ</i>	βL, AG, QL, TC, CHL	nd	oui	(Bador <i>et al.</i> , 2013)

Aeromonas

<i>A. hydrophilia</i>	AheABC	RND	<i>aheR</i>	βL, ERY, TC, TMP	nd	nd	(Hernould <i>et al.</i> , 2008)
-----------------------	--------	-----	-------------	------------------	----	----	---------------------------------

Bacteroides

<i>B. fragilis</i>	similaire à NorA/BmR	MFS	?	FOX, QL, CHL	FOX (2x), NOR (4x), OFX (2x), SPX (2x), CHL (2x)	nd	(Miyamae <i>et al.</i> , 1998)
--------------------	----------------------	-----	---	--------------	--	----	--------------------------------

	BmeABC ^c	RND	?	βL, QL	nd	oui	(Wexler, 2012) (Wexler, 2007) (Pumbwe <i>et al.</i> , 2006)
--	---------------------	-----	---	--------	----	-----	---

Brucella

<i>B. melitensis</i>	NorMI	MATE	?	AMP, GEN, CIP, NOR	nd	nd	(Braibant <i>et al.</i> , 2002)
----------------------	-------	------	---	--------------------	----	----	---------------------------------

<i>B. suis</i>	BepDE	RND	<i>bepR</i>	AMP, CIP, NOR, DOX, TET	nd	nd	(Martin <i>et al.</i> , 2009)
----------------	-------	-----	-------------	-------------------------	----	----	-------------------------------

Burkholderia

<i>B. cenocepacia</i>	BcrA	MFS	?	NAL, TET	nd	oui	(Wigfield <i>et al.</i> , 2002)
	CeoAB-OpcM	RND	<i>ceoR</i>	CIP, CHL, TMP	nd		(Guglierame <i>et al.</i> , 2006)
	RND2	RND	?	STR, QL	nd	nd	(Guglierame <i>et al.</i> , 2006)
	RND3	RND	?	(AG) ^b , NAL, TET	nd	nd	(Buroni <i>et al.</i> , 2009) (Hamad <i>et al.</i> , 2010)
	RND4	RND	?	ATM, AG, QL, CHL	nd	nd	(Bazzini <i>et al.</i> , 2011)
	RND9	RND	?	ATM, TOB, QL	nd	nd	(Bazzini <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. pseudomallei</i>	AmrAB-OprA	RND	<i>amrR</i>	AG, ML, TC	KAN (2x), CET (16-32x), CLR (2x), ERY (4x)	oui	(Kumar <i>et al.</i> , 2008) (Mima <i>et al.</i> , 2011)
	BpeAB-OprB	RND	<i>bpeR</i>	CAZ, (AG) ^b , (ML) ^b , QL, (TC) ^b , (CHL) ^b	nd	oui	(Kumar <i>et al.</i> , 2008) (Chan <i>et al.</i> , 2004) (Mima and Schweizer, 2010)

Campylobacter

<i>C. jejuni</i>	CmeABC	RND	<i>cmeR</i>	AMP, CTX, ERY, QL, TET, CHL	ERY (8x), CIP (32x), TET (32x), AMP (8x), CHL (16x)	oui	(Pumbwe and Piddock, 2002) (Pumbwe <i>et al.</i> , 2004) (Akiba <i>et al.</i> , 2006)
	CmeDEF	RND	?	AMP, PMB	nd	oui	(Pumbwe <i>et al.</i> , 2004) (Akiba <i>et al.</i> , 2006)

Enterobacter

<i>E. aerogenes</i>	AcrAB-TolC	RND	<i>acrR</i>	βL, QL, TET, CHL	CAZ (2x), FEP (4x), NAL (32x), NOR (16x), TET (8x), CHL (64x)	oui	(Ghisalberti <i>et al.</i> , 2005)
	EefABC	RND	?	ERY, CIP, TC, CHL	nd	nd	(Masi <i>et al.</i> , 2007)
<i>E. cloacae</i>	AcrAB-TolC	RND	<i>acrR</i> , <i>ramA</i>	MEM, AG, ERY, CIP, TC, CHL	MEM (2x), CIP (8x), MIN (>8x), TET (16x), TGC (64x), CHL (>32x)	oui	(Hornsey <i>et al.</i> , 2010b) (Perez <i>et al.</i> , 2007)

Escherichia

<i>E. coli</i>	MacAB-TolC	ABC	?	ML	nd	nd	(Nishino <i>et al.</i> , 2009) (Nishino and Yamaguchi, 2001)
	Fsr	MFS	?	TMP	nd	nd	(Nishino <i>et al.</i> , 2009)
	MdfA	MFS	?	AG, ML, QL, TET, CHL	nd	nd	(Gibbons <i>et al.</i> , 2003) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
	MdtG	MFS	?	FOS	nd	nd	(Nishino and Yamaguchi, 2001) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
	MdtH	MFS	?	QL	nd	nd	(Nishino and Yamaguchi, 2001) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
	Bcr	MFS	?	TET	nd	nd	(Hayashi <i>et al.</i> , 2010) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
	MdtL	MFS	?	CHL	nd	nd	(Nishino and Yamaguchi, 2001) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
	MdtM	MFS	?	NOR, CHL	nd	nd	(Nishino and Yamaguchi, 2001) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)

AcrAB-TolC	RND	<i>acrR, acrS, marA, robB, marR, sdiA, soxS</i>	β L, ML, QL, TET, CHL, TMP	nd	oui	(Swick <i>et al.</i> , 2011) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
MdtABC	RND	<i>baeSR, cpxAR</i>	QL, FOS	nd	nd	(Nishino and Yamaguchi, 2001) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
AcrAD-TolC	RND	<i>baeSR, cpxAR</i>	AG	nd	nd	(Nishino and Yamaguchi, 2001)
AcrEF-TolC	RND	<i>acrS</i>	β L, ML, QL, TET, CHL, TMP	nd	nd	(Nishino and Yamaguchi, 2001) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
MdtEF	RND	<i>evgSA, gadX</i>	ERY	nd	nd	(Nishino and Yamaguchi, 2001) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
MdtJK	SMR	?	NAL, FOS	nd	nd	(Nishino and Yamaguchi, 2001) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)
NorE	MATE	?	ENX, NOR, CHL, FOS, TMP	nd	oui	(Gibbons <i>et al.</i> , 2003) (Nishino <i>et al.</i> , 2009)

Haemophilus

<i>H. influenzae</i>	AcrAB	RND	<i>acrR</i>	ERY, NOV, RIF	nd	nd	(Sanchez <i>et al.</i> , 1997)
----------------------	-------	-----	-------------	---------------	----	----	--------------------------------

Klebsiella

<i>K. pneumoniae</i>	AcrAB	RND	<i>acrR, ramR, ramA, marR, marA, soxR, soxS, and rob</i>	β L, QL, TC, CHL	CAZ (2x), CRO (2x), CTX (2x), FOX (4x), CIP (16x), LVX (32x), NAL (16x), TET (4x), TGC (8x), CHL (64x)	oui	(Bialek-Davenet <i>et al.</i> , 2011)
----------------------	-------	-----	--	------------------------	--	-----	---------------------------------------

Pseudomonas

<i>P. aeruginosa</i>	MexAB-OprM	RND	<i>armR, mexR (nalB), nalC, nalD</i>	β L, ERY, QL, TET, CHL, TMP	CAR (4-8x), CAZ (2-4x), CPO (4-8x), FEP (2-4x), ERY (1-2), CIP (2-4x), NAL (4x), NOV (4x), TET (2-4), CHL (4-8x), TMP (8-16x)	oui	(Lister <i>et al.</i> , 2009) (Srikumar <i>et al.</i> , 2000)
	MexCD-OprJ	RND	<i>nfxB</i>	CPO, ERY, QL, TET, CHL, TMP	CPO (8x), CIP (8x), OFX (8-32x), TET (1-4x), CHL (1-4x)	oui	(Lister <i>et al.</i> , 2009) (Jeannot <i>et al.</i> , 2008)

	MexEF-OprN	RND	<i>mexT, mexS, mvaT</i>	QL, TET, CHL, TMP	IPM (4-8x), CIP (4-8x), NOR (8-16x), TET (2x), CHL (≥16x), TMP (4-8x)	oui	(Lister <i>et al.</i> , 2009) (Sobel <i>et al.</i> , 2005b)
	MexMN-OprM	RND	?	CHL	nd	nd	(Mima <i>et al.</i> , 2005)
	MexPQ-OpmM	RND	?	ERY, QL, TET, CHL	nd	nd	(Mima <i>et al.</i> , 2005)
	MexXY-OprM	RND	<i>mexZ, ParRS, PA5471 (armZ)</i>	CPO, FEP, AG, ERY, QL, TET, CHL	FEP (2-4x), AMK (2-8x), APR (2-4x), FOR (4x), GEN (2-8x), ISP (4x), NEO (2x), NET (4x), PAR (4-8x), SPT (2x), STR (4-8x), TOB (2-4x) CIP (4x)	oui	(Lister <i>et al.</i> , 2009) (Westbrock-Wadman <i>et al.</i> , 1999) (Fournier <i>et al.</i> , 2013)
	MexGHI-OpmD	RND	<i>soxR</i>	NOV	NOV (16x)	nd	(Lister <i>et al.</i> , 2009)
	MexJK-OprM	RND	<i>mexL</i>	ERY	ERY (2x)	oui	(Chuanchuen <i>et al.</i> , 2005) (Hocquet <i>et al.</i> , 2006)
	MexVW-OprM	RND	?	CPO, ERY, QL, TET, CHL	CPO (4x), ERY (2x), NOR (8x), OFX (8x), TET (4x), CHL (8x)	nd	(Li <i>et al.</i> , 2003b) (Abramson <i>et al.</i> , 2003)
	MuxABC-OpmB	RND	?	ATM, ERY, NOV	ATM (2x), ERY (2x), NOV (8x)	nd	(Mima <i>et al.</i> , 2009)
	EmrE	SMR	?	AG	nd	nd	(Li <i>et al.</i> , 2003a)
	PmpM	MATE	?	QL	nd	nd	(He <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. putida</i>	ArpABC	RND	<i>arpR</i>	βL, STR, ERY, NAL, NOV, TET, CHL, PMB, RIF	nd	nd	(Kieboom and de Bont, 2001)
	MepABC	RND	<i>mepR</i>	PEN, ERY, NOV, AMP	nd	nd	(Fukumori <i>et al.</i> , 1998)
	TtgABC	RND	<i>ttgR</i>	βL, QL, TGC, CHL, RIF, SMX	nd	nd	(Fernandez <i>et al.</i> , 2012b)
	TtgGHI	RND	<i>ttgV</i>	AMP, CAR, TET	nd	nd	(Rojas <i>et al.</i> , 2001)
<i>Salmonella</i>							
<i>S. Typhimurium</i>	MacAB	ABC	<i>phoPQ</i>	ERY	nd	nd	(Nishino <i>et al.</i> , 2009)
	EmrAB	MFS	?	NAL, NOV	nd	nd	(Nishino <i>et al.</i> , 2009)

MdfA	MFS	?	NOR, TET, CHL	nd	nd	(Nishino <i>et al.</i> , 2009)
AcrAB-TolC	RND	<i>ramA</i> , <i>ramR</i> , <i>acrR</i> , <i>marA</i> , <i>soxS</i>	ML, QL, TET, CHL	nd	oui	(Nishino <i>et al.</i> , 2009) (Abouzeed <i>et al.</i> , 2008)
AcrEF	RND	<i>acrS</i>	ERY, QL, TET, CHL	nd	nd	(Nishino <i>et al.</i> , 2009)
MdtABC	RND	<i>baeSR</i> , <i>cpxAR</i>	NOV	nd	nd	(Nishino <i>et al.</i> , 2009)
MdsABC	RND	<i>golS</i>	NOV	nd	nd	(Nishino <i>et al.</i> , 2009)

Serratia

<i>S. marcescens</i>	SdeAB-HasF	RND	<i>sdeR</i>	QL, CHL	nd	oui	(Dalvi and Worobec, 2012) (Begic and Worobec, 2008)
	SdeCDE	RND	?	NOV	nd	nd	(Begic and Worobec, 2008)
	SdeXY	RND	?	QL, TET	nd	oui	(Hornsey <i>et al.</i> , 2010a)

Stenotrophomonas

<i>S. maltophilia</i>	SmrA	ABC	?	QL, TET	nd	nd	(Al-Hamad <i>et al.</i> , 2009)
	SmeABC	RND	<i>smeRS</i>	βL, AG, QL, TET, CHL, TMP	CAR (64x), CEF (32x), CFP (4x), CPO (2x), CTX (8x), FEP (4x), PEN (16x), AMK (>2x), GEN (>4x), KAN (8x), STR (> 8x), TOB (≥2x), CIP (2-4x), NAL (2-4 x), NOR (2- 4x), TVA (4x), AMP (64- 128x), CHL (2-4x), TMP (2x)	oui	(Li <i>et al.</i> , 2002) (Cho <i>et al.</i> , 2012) (Crossman <i>et al.</i> , 2008)
	SmeDEF	RND	<i>smeT</i>	βL, KAN, ML, QL, TC, CHL, RIF, TMP	AZM (2x), CLI (8x), ERY (2x), CIP (4x), GEM (8x), MXF (8x), NAL (4x), NOR (8x), NOV (2x), TVA (32x), DOX (8x), MIN (8x), TET (2x), TGC (4x), CHL (8x), RIF (2x), TMP (8x)	oui	(Gould and Avison, 2006) (Zhang <i>et al.</i> , 2001) (Crossman <i>et al.</i> , 2008)

	SmeIJK	RND	?	AG, CIP, TC	nd	nd	(Gould <i>et al.</i> , 2004) (Chen <i>et al.</i> , 2011) (Crossman <i>et al.</i> , 2008)
	SmeVWX	RND	<i>smlt1827</i>	QL, TC, CHL	nd	nd	(Chen <i>et al.</i> , 2011)
	SmeYZ	RND	<i>smlt2199-30</i>	AG	nd	nd	(Chen <i>et al.</i> , 2011) (Gould <i>et al.</i> , 2004) (Crossman <i>et al.</i> , 2008)
<i>Vibrio</i>							
<i>V. cholerae</i>	VcaM	ABC	?	QL, TC	nd	nd	(Begum <i>et al.</i> , 2005) (Huda <i>et al.</i> , 2003)
	EmrD-3	MFS	?	ERY, MIN, CHL, RIF, TMP,	nd	nd	(Smith <i>et al.</i> , 2009)
	VceCAB	MFS	<i>vceR</i>	NAL, CHL	nd	nd	(Woolley <i>et al.</i> , 2005)
	VexAB/VexCD	RND	<i>vexR</i> / ?	AG, QL	nd	nd	(Bina <i>et al.</i> , 2006)
	VcrM	MATE	?	AG, QL	nd	nd	(Begum <i>et al.</i> , 2005)
	VcmA,B,D,H,N	MATE	?	AG, QL	nd	nd	(Begum <i>et al.</i> , 2005) (Huda <i>et al.</i> , 2001)

^a Les chiffres représentent l'augmentation, en nombre de fois de la CMI, de la résistance consécutive à la surproduction du système d'efflux. ^b Résultats divergents d'après les diverses données de la littérature. ^c Parmi les 16 systèmes RND identifiés chez *B. fragilis* BmeABC (1-16), BmeABC 1, 3, 9, 11, 12, 15 et 16 semblent impliqués dans la résistance aux antibiotiques. nd : non déterminé.

2. Contribution des pompes à la résistance des principaux BGN-NF

P. aeruginosa est en fréquence d'isolement, le bacille non fermentaire le plus important à l'hôpital (**Tableau 2**). D'autres espèces telles que *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* et les bactéries du complexe *B. cepacia* sont régulièrement impliquées dans des infections aiguës ou chroniques. Si la sévérité des infections nosocomiales causées par ces germes est conditionnée avant tout par la virulence propre de chaque espèce et par les comorbidités des patients concernés, elle dépend aussi de la capacité des bactéries à accumuler des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Bien que la surproduction des systèmes d'efflux conduise, en général, à des niveaux de résistance modérés en l'absence d'autres mécanismes, elle peut engendrer chez ces espèces nosocomiales naturellement peu sensibles des phénotypes multi-résistants, source de difficultés thérapeutiques.

Tableau 2. Part relative des différents bacilles non fermentaires dans les infections nosocomiales en France, 2012.

Bacilles à Gram négatif non fermentaires	Nombre d'infections	Part relative parmi les BGN-NF (parmi les micro-organismes isolés) %
<i>P. aeruginosa</i>	1053	82,2 (8,4)
<i>A. baumannii</i>	74	5,8 (0,6)
<i>S. maltophilia</i>	71	5,5 (0,6)
Autres <i>Pseudomonas</i> et apparentés	32	2,5 (0,3)
Autres BGN-NF	19	1,5 (0,2)
<i>Acinetobacter</i> , autres espèces	15	1,2 (0,1)
<i>Achromobacter</i>	13	1,0 (0,1)
<i>B. cepacia</i>	4	0,3 (< 1)

D'après l'INVS (INstitut de Veille Sanitaire) (<http://www.invs.sante.fr>).

2.1. *Acinetobacter*

Après avoir subi de profonds remaniements dans le milieu des années 1980, la taxonomie du genre *Acinetobacter* distingue aujourd'hui 34 sous-espèces dont 27 correspondent à des espèces différentes (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Parmi celles-ci, *A. baumannii* et dans une moindre mesure les sous-espèces 3 et 13TU (baptisées *A. pittii* et *A. nosocomialis*, respectivement) ont émergé en tant que pathogènes opportunistes impliqués dans diverses infections telles que des pneumonies, des bactériémies, des méningites, des infections urinaires et des infections superficielles (Manchanda *et al.*, 2010). Même si le rôle de

A. baumannii dans les infections nosocomiales est connu de longue date (Bouvet and Grimont, 1987), l'intérêt pour ce pathogène et ses mécanismes de résistance a été renouvelé en 2001 par l'émergence, en France, d'un clone épidémique multi-résistant producteur d'une β -lactamase à spectre élargi, VEB-1 (Poirel *et al.*, 2003). C'est dans ce contexte, que le séquençage de plusieurs génomes de *A. baumannii* a révélé la présence, chez cette espèce, de 7 systèmes d'efflux de la famille RND, plus de 30 systèmes MFS, ainsi que quelques transporteurs MATE, SMR et ABC. Cependant, seules 3 pompes RND (AdeABC, AdeIJK, AdeFGH) (**Figure 12**), 2 MFS (CraA, AmvA) et 1 SMR (AbeS) ont été reconnues comme capables de transporter des antibiotiques (Coyne *et al.*, 2011). Chez *A. pittii*, deux autres systèmes RND nommés AdeDE et AdeXYZ ont également été identifiés (**Tableau 3**) (Chau *et al.*, 2004).

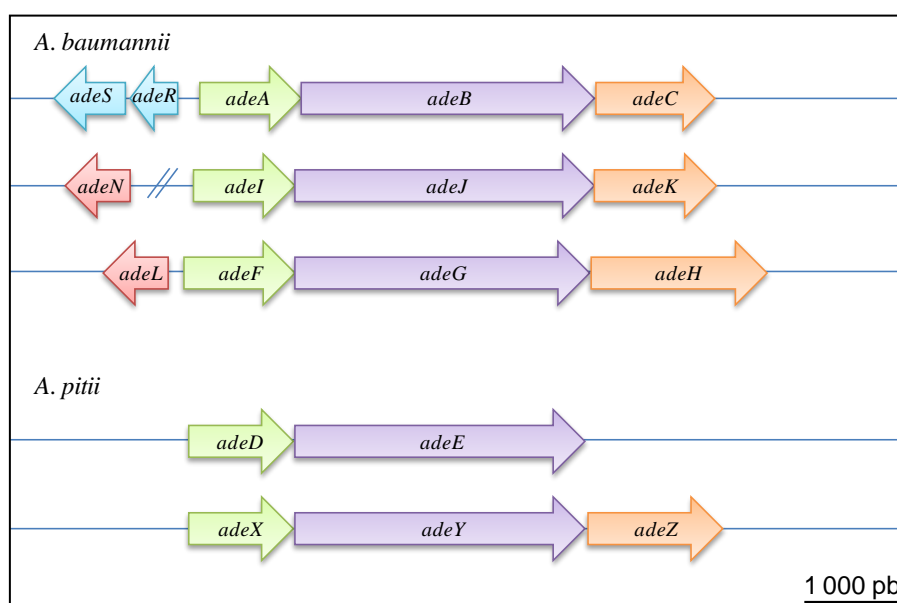


Figure 12. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de *Acinetobacter* impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

Les gènes déterminant les différents constituants de la pompe d'efflux sont représentés en vert (la protéine adaptatrice), en violet (le transporteur RND) et en orange (la protéine de membrane externe). Les gènes situés en amont de ces opérons codent pour des régulateurs : répresseurs transcriptionnels (rouge) et système à deux composants (bleu).

Tableau 3. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de *Acinetobacter*.

Organisme	Nom du système	Famille du transporteur	Substrats pris en charge	Occurrence du système ^a	Contribution à la résistance		
					naturelle	acquise	souches cliniques
<i>A. baumannii</i>	AdeABC	RND	CTX, FEP, IPM, AMK, GEN, KAN, NET, TOB, AZM, CLI, ERY, CIP, LVX, MXF, NOR, OFX, PEF, SPX, MIN, TET, TGC, CHL, TMP	80% des isolats cliniques, aucune souche environnementale, 1 souche de <i>A. nosocomialis</i>	nd ^b	oui	oui
	AdeIJK	RND	ATM, CAZ, CTX, FEP, IPM, TIC, AMK, CLI, ERY, CIP, LVX, NOR, PEF, MIN, TET, TGC, CHL, RIF, TMP/SMX	100% des souches	probable ^c	oui	oui
	AdeFGH	RND	IPM, TIC, TOB, CLI, CIP, NOR, MIN, TET, TGC, CHL, RIF, TMP/SMX	90% des isolats cliniques	non	oui	nd
	CraA	MFS	CHL	100% des souches	nd	nd	oui
	AmvA	MFS	ERY, CIP, NOR, NOV	nd	probable ^c	nd	oui
	AbeS	SMR	ERY, CIP, NAL, NOR, NOV, CHL	nd	nd	nd	oui
	AbeM	MATE	GEN, KAN, ERY, CIP, NOR, OFX, CHL	100% des souches	nd	nd	nd
<i>A. pittii</i>	AdeDE	RND	CAZ, MEM, AMK, ERY, CIP, TET, CHL RIF	70% des isolats cliniques 1 souche d' <i>A. nosocomialis</i>	nd	nd	oui
	AdeXYZ ^d	RND	nd	90% des souches, 1 souche de <i>A. nosocomialis</i>	nd	nd	nd

^a Détection des gènes par PCR, ^b Système non exprimé et qui n'a pas été inactivé chez une souche sauvage, ^c Système exprimé et qui n'a pas été inactivé chez une souche sauvage. ^d Homologue de AdeIJK. nd : non déterminé.

2.1.1. Contribution de l'efflux dans la résistance naturelle

L'analyse des systèmes d'efflux chez les *Acinetobacter* a été principalement abordée en inactivant les gènes de diverses pompes chez des souches cliniques multi-résistantes. Parce que la même démarche n'a pas été appliquée à des souches sauvages, la contribution des transporteurs considérés à la résistance naturelle n'est pas, à l'heure actuelle, clairement établie. D'après les résultats d'expériences de Northern blotting, les systèmes AdeIJK et AmvA, contrairement à AdeABC, apparaissent exprimés chez les souches sensibles ce qui laisse penser qu'ils participent à la résistance de base de *A. baumannii* (Marchand *et al.*, 2004) (Damier-Piolle *et al.*, 2008) (Rajamohan *et al.*, 2010). En revanche, l'inactivation par des techniques de recombinaison homologue du système AdeFGH chez une souche clinique n'a pas permis de confirmer son rôle dans ce domaine (Coyne *et al.*, 2010b). Aucun argument ne permet de statuer sur la contribution des autres pompes à la résistance naturelle.

2.1.2. Mutations et résistance acquise

La sélection de mutants sur des milieux renfermant des antibiotiques, éventuellement suivie du séquençage de leur génome, a permis de démontrer l'implication des systèmes AdeABC, AdeIJK et AdeFGH dans la résistance acquise et d'identifier certaines mutations à l'origine de la surproduction de ces pompes.

L'emploi de tigécycline (Peleg *et al.*, 2007), de moxifloxacine (Pannek *et al.*, 2006) ou de gentamicine (Marchand *et al.*, 2004) a permis la sélection *in vitro* de mutants surproduisant le système AdeABC, avec 25 à 73 fois plus de transcrits du gène *adeB* que la souche d'origine sensible. La surproduction du système a été associée à une résistance accrue notamment au céfépime, aux aminosides, à l'érythromycine, et aux fluoroquinolones (**Tableau 4**). Chez la plupart des isolats résistants, les mutations à l'origine du phénotype étaient localisées dans les gènes *adeR* ou *adeS* codant le système à deux composants AdeRS (Marchand *et al.*, 2004). Cependant, Peleg *et al.* ont démontré l'existence de mutants chez lesquels ces gènes sont intacts, ce qui suggère la présence d'au moins un mécanisme de régulation supplémentaire encore inconnu pour AdeABC (Peleg *et al.*, 2007).

La surexpression artificielle du système AdeIJK à partir d'un plasmide chez *E. coli* et *Acinetobacter* étant létale, Damier-Piolle *et al.* ont conclu dans un premier temps que cette pompe ne pouvait être surexprimée sans effets délétères (Damier-Piolle *et al.*, 2008). Cependant, deux années plus tard, Coyne *et al.* sont parvenus à sélectionner *in vitro* des

mutants surproduisant ce système sur des gradients de tétracycline et de céfotaxime, avec une augmentation de la quantité de transcrits des gènes *adeI*, *adeJ* et *adeK* comprise entre 2,5 et 5 fois par rapport au niveau naturel (Coyne *et al.*, 2010a). Rosenfeld *et al.* ont démontré la présence chez ces bactéries de mutations dans un gène distant de l'opéron *adeIJK*, codant pour un régulateur transcriptionnel de la famille TetR, dénommé AdeN (Rosenfeld *et al.*, 2012). Compte tenu du faible niveau de résistance des mutants (2 à 4 fois), le rôle de AdeIJK paraît relativement limité (**Tableau 4**) (Coyne *et al.*, 2010a).

Tableau 4. Contribution des systèmes d'efflux AdeABC, AdeIJK et AdeFGH à la résistance acquise de *A. baumannii*.

Antibiotiques	BM4587			4664
	AdeABC ⁺⁺ /WT ^{a,c}	AdeIJK ⁺⁺ /WT ^{a,c}	AdeFGH ⁺⁺ /WT ^{a,c}	AdeFGH ⁺⁺ /Δ <i>adeFGH</i> ^{b,d}
ATM	(2)	2	1	1
CAZ	1	4	(2)	nd
FEP	8	2	1	1
IPM	2	1	2	2
TIC	(4)	2	2	1
AMK	16	2	1	1
GEN	16	1	1	nd
TOB	16	1	2	nd
CLI	nd	nd	nd	>128
ERY	8	4	1	1
CIP	4	4	4	>16
NOR	8	2	8	>16
MIN	2	4	4	8
TET	2	4	2	2
TGC	2	4	4	16
CHL	>2	>2	>2	>16
RIF	1	2	2	1
TMP/SMX	1	2	1	8

^a Les chiffres représentent l'augmentation ou la (diminution), en nombre de fois de la CMI, de la résistance consécutive à la surproduction du système d'efflux (++) . ^b Les chiffres représentent la diminution, en nombre de fois de la CMI, de la résistance consécutive à l'inactivation du système AdeFGH. BM4587 : souche clinique non-MDR. 4664 : mutant surproducteur du système AdeFGH sélectionné *in vitro* à partir d'une souche clinique MDR BM4454 préalablement délétée des gènes *adeABC* et *adeIJK*. nd : non déterminé. WT (*Wild Type*) : sauvage. Adapté de ^c(Coyne *et al.*, 2010b)^d(Coyne *et al.*, 2011).

Coyne *et al.* ont également sélectionné des mutants spontanés surproducteurs du système d'efflux AdeFGH sur des milieux supplémentés en chloramphénicol ou en norfloxacine (Coyne *et al.*, 2010a) (Coyne *et al.*, 2010b). Les bactéries obtenues surexprimaient l'opéron *adeFGH* 2,9 à 3,8 fois plus que la souche parentale et présentaient des mutations dans un gène codant un régulateur transcriptionnel de la famille LysR, appelé *adeL*, localisé en amont et transcrit en sens inverse de *adeFGH*. L'inactivation du système

chez un de ces mutants préalablement délété des opérons *adeABC* et *adeIJK* a montré que celui-ci pouvait conférer un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones, à la tigécycline, au triméthoprim et à la clindamycine, ainsi qu'une résistance modérée aux tétracyclines, à la tigécycline et au sulfaméthoxazole, sans affecter la sensibilité aux β -lactamines et aux aminosides (**Tableau 4**).

2.1.3. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches cliniques

Hormis pour le système AdeFGH, l'inactivation de chacun des 8 systèmes d'efflux de *A. baumannii* capables d'exporter des molécules d'antibiotiques a conduit systématiquement à une diminution de la résistance chez des isolats cliniques de phénotype MDR (**Tableau 5**).

L'inactivation de AdeABC, premier système RND caractérisé chez *A. baumannii* et chez une souche de *A. nosocomialis*, s'est accompagnée d'une diminution de la résistance à un large panel d'antibiotiques (aminosides, β -lactamines, fluoroquinolones, tétracyclines, tigécycline, macrolides, chloramphénicol et triméthoprim) (**Tableau 5**) (Roca *et al.*, 2011). L'étude d'autres souches a montré cependant que les gènes codant cette pompe ne sont pas systématiquement présents au sein de l'espèce mais associés aux souches isolées dans un contexte médical, celles de l'environnement en étant dépourvues (Huys *et al.*, 2005). Si parmi les souches cliniques, toutes possédaient au moins un des gènes codant le système ou son régulateur, seules 82% d'entre elles refermaient les gènes *adeRS* et *adeAB*. Le gène *adeC*, quant à lui, n'a été retrouvé que chez 35% d'entre elles (Nemec *et al.*, 2007). Toutefois, l'absence de celui-ci n'aurait que peu d'impact sur les niveaux de résistance puisqu'il n'est pas essentiel au fonctionnement de la pompe (Marchand *et al.*, 2004). D'autre part, Nemec *et al.* ont constaté que le système AdeABC pouvait être réprimé ou altéré malgré la présence de ses gènes. Parmi les 51 isolats cliniques résistants à moins de 2 antibiotiques substrats du système, 60% possédaient tous les gènes nécessaires au fonctionnement de la pompe (*adeRS* et *adeAB*) (Nemec *et al.*, 2007). Cependant, il n'a pas été possible de dégager une corrélation entre la présence de celle-ci, son expression et la résistance observée, suggérant l'implication d'autres mécanismes plus efficaces (Chiu *et al.*, 2010) (Bratu *et al.*, 2008). Néanmoins, quelques antibiotiques (nétilmicine, tigécycline, ciprofloxacine et association ampicilline/sulbactam) semblent déroger à cette règle. En effet, l'étude d'une collection de 116 isolats cliniques a révélé que les souches avec une CMI de la nétilmicine ≥ 4 mg/mL (n=65) contenaient les gènes *adeRS* et *adeAB* ainsi qu'une résistance augmentée aux substrats

du système AdeABC et que celles présentant une PCR négative pour un ou plusieurs de ces gènes affichaient des CMI ≤ 2 mg/mL (n=51). A partir de ces résultats, Nemec *et al.* ont proposé que l'augmentation de la résistance à la nétilmicine était corrélée à la surproduction du système AdeAB(C). Cet antibiotique serait, d'après ces auteurs, un marqueur intéressant pour évaluer la surexpression de l'opéron *adeABC* (Nemec *et al.*, 2007). Une seconde étude réalisée par Ruzin *et al.* sur une collection de 106 souches de *A. baumannii* a pu établir une relation linéaire entre le logarithme de la quantité de transcrits du gène *adeA* et celui de la CMI de la tigécycline (entre 0,5 et 16 μ g/mL), confortant l'idée que la surexpression de *adeABC* est un mécanisme prédominant dans la résistance à la tigécycline par rapport aux souches sensibles (Ruzin *et al.*, 2010). Peleg *et al.* ont corroboré ces résultats en montrant que la quantité d'ARNm du gène *adeB* était 40 à 54 fois chez les isolats résistants à la tigécycline (Peleg *et al.*, 2007). Enfin, une dernière étude a pu établir une corrélation directe entre la surexpression de *adeB* et les niveaux de résistance à la ciprofloxacine et à l'ampicilline/sulbactam (Chiu *et al.*, 2010).

AdeIJK, second système d'efflux de type RND décrit chez *A. baumannii*, est présent chez toutes les souches et se révèle spécifique de l'espèce. Comme AdeABC, il est responsable de la multi-résistance chez *A. baumannii*. Son inactivation chez un isolat MDR a entraîné la diminution de la résistance aux β -lactamines, aux fluoroquinolones, aux tétracyclines, aux lincosamides, à la tigécycline, à la rifampicine ainsi qu'au chloramphénicol, au triméthoprim, à l'érythromycine et à la novobiocine (**Tableau 5**). AdeABC et AdeIJK surproduits simultanément chez une même bactérie ont des effets cumulatifs sur les CMI de leurs substrats communs. L'effet est même synergique pour certaines molécules comme la tigécycline, la lévofloxacine et la péfloxacine puisque la double délétion des pompes augmente respectivement d'un facteur 64, 32 et 16 la sensibilité de la souche alors que la simple délétion de *adeABC* l'augmente d'un facteur 8, 4 et 2 et celle de *adeIJK* d'un facteur 2 (**Tableau 5**) (Damier-Piolle *et al.*, 2008).

Comme *adeABC*, l'opéron *adeFGH* n'a pas été détecté chez toutes les souches cliniques de l'espèce, mais chez approximativement 90% d'entre elles. Cependant, aucun mutant surexprimant ce système n'a été à ce jour identifié dans ce contexte (Coyne *et al.*, 2010b).

CraA, transporteur à 12 segments transmembranaires de la famille MFS, est l'homologue de la pompe d'efflux MdfA de *E. coli*. Mais contrairement à cette dernière et d'après les résultats obtenus chez un isolat clinique MDR, CraA semble avoir un spectre de substrats plutôt restreint (chloramphénicol) (**Tableau 5**). Le gène codant pour CraA a été retrouvé chez 82/82 souches cliniques mais son niveau d'expression n'a pas été mesuré, ce

qui aurait permis d'établir un lien entre la pompe et les niveaux de résistance, notamment au chloramphénicol (Roca *et al.*, 2009).

AmvA, un second transporteur MFS caractérisé chez *A. baumannii*, comprend 14 segments transmembranaires. Détecté chez toutes les souches de *A. baumannii* étudiées par amplification de son gène, il est surexprimé 2 à 4 fois chez les isolats cliniques MDR par rapport aux souches sensibles. Il a été démontré que son inactivation chez un isolat augmentait significativement la sensibilité de ce dernier à l'érythromycine et dans une moindre mesure à la ciprofloxacine, la norfloxacine et la novobiocine (**Tableau 5**) (Rajamohan *et al.*, 2010).

AbeS, membre de la famille SMR, a été caractérisé pour la première fois chez un isolat clinique MDR de *A. baumannii*. Son rôle dans la résistance au chloramphénicol, aux fluoroquinolones, à l'érythromycine et à la novobiocine a été démontré suite à l'inactivation du gène *abeS* (**Tableau 5**) (Srinivasan *et al.*, 2009).

AdeDE, dont le transporteur (AdeE) appartient à la famille RND, a été mis en évidence chez une souche de *A. pittii* (Chau *et al.*, 2004). Codées par un opéron de deux gènes (*adeDE*), les protéines AdeDE pourraient recruter une protéine de membrane externe déterminée par un autre opéron pour former un système d'efflux fonctionnel. Le gène *adeE* a été décelé chez 70% des souches de *A. pittii* et chez 1 souche de *A. nosocomialis* (Chu *et al.*, 2006). Son inactivation chez un isolat clinique MDR a montré l'implication de la pompe dans la résistance aux aminosides, aux carbapénèmes, aux fluoroquinolones, à la ceftazidime, à l'érythromycine, à la tétracycline, à la rifampicine et au chloramphénicol (**Tableau 5**) (Chau *et al.*, 2004).

Tableau 5. Conséquences de l'inactivation des différents systèmes d'efflux de *Acinetobacter* sur la résistance de souches cliniques MDR.

Antibiotiques	<i>A. baumannii</i>						<i>A. pittii</i>
	BM4454			ATCC 19606	AC0037		8108
	$\Delta adeABC^a$	$\Delta adeIJK^a$	$\frac{\Delta adeABC}{\Delta adeIJK^a}$	$\Delta craA^{a,b}$	$\Delta amvA^{a,c}$	$\Delta abeS^{a,d}$	$\Delta adeDE^{a,e}$
ATM	1	nd	8	nd	nd	nd	nd
CAZ	1	nd	4	nd	nd	nd	8
CTX	1,4	4	4	nd	nd	nd	nd
FEP	2	nd	16,1	nd	nd	nd	nd
IPM	1,1	2	2,2	1	nd	nd	nd
MEM	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4
TIC	1,1	8	8,8	nd	nd	nd	nd
AMK	1,8	nd	2,2	nd	1	1	32
GEN	≥ 32	nd	nd	nd	nd	nd	nd
KAN	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NET	32	nd	nd	nd	nd	nd	nd
TOB	≥ 8	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AZM	64	1	64	nd	nd	nd	nd
CLI	>8,1,8	>4	>128,>128	1	nd	nd	nd
ERY	2,4,8	2	8,8	1	4	8	32
CIP	≥ 2	nd	>16	1	2	2	2
LVX	4	2	32	nd	nd	nd	nd
MXF	4	1	32	nd	nd	nd	nd
NAL	nd	nd	nd	1	1	2	nd
NOR	>4,8	nd	>16	1	2	2	nd
NOV	nd	nd	nd	nd	2	2	nd
OFX	16	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PEF	2,16	2	16	nd	nd	nd	nd
SPX	32	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MIN	1,4	8	16,32	nd	1	nd	nd
TET	4,8,8	16	32,128	1	1	1	32
TGC	16,8	2	64,64	nd	nd	nd	nd
CHL	>2,2,4	4	>16,16	>128	nd	4	4
RIF	1,1	2	1,2	nd	1	1	32
TMP	16	nd	8	nd	1	1	nd
TMP/SMX	1	nd	1	nd	nd	nd	nd

^a Les chiffres représentent la diminution, en nombre de fois de la CMI, de la résistance consécutive à l'inactivation du système d'efflux. BM4454 : souche clinique MDR surproductrice du système AdeABC. ATCC1906 : souche clinique MDR de *A. baumannii*. AC0037 : souche clinique MDR de *A. baumannii* surproduisant AmvA. 8108 : souche clinique MDR de *A. pittii*. nd : non déterminé. Adapté de (Coyne *et al.*, 2011) (Damier-Piollle *et al.*, 2008) (Magnet *et al.*, 2001) ^b(Roca *et al.*, 2009) ^c(Rajamohan *et al.*, 2010) ^d(Srinivasan *et al.*, 2009) ^e(Chau *et al.*, 2004).

2.1.1. Systèmes d'efflux dont la contribution à la résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter* n'a pas été clairement démontrée

Le gène codant le transporteur AbeM, membre de la famille MATE, a été identifié chez tous les isolats cliniques de *A. baumannii* étudiés. Son implication dans la résistance reste hypothétique puisque les effets de son inactivation ou de sa surexpression n'ont pas été rapportés (Bratu *et al.*, 2008). Néanmoins, il a été constaté que son expression chez une souche sensible de *E. coli* conduisait à une résistance accrue à la norfloxacine, l'ofloxacine, la ciprofloxacine, la kanamycine, la gentamicine, l'érythromycine et le chloramphénicol (Su *et al.*, 2005).

Il en est de même pour AdeXYZ, dont le transporteur relève de la famille RND. Retrouvé chez 90% des souches de *A. pittii* étudiées et 1 souche de *A. nosocomialis*, cette pompe présente plus de 97% d'identité de séquence avec AdeIJK (AdeX/AdeI : 98%, AdeY/AdeJ : 97%, AdeZ/AdeK : 97%). Cependant, l'inactivation des gènes de ce système n'ayant pu être obtenue, son impact sur la résistance demeure inconnu (Chu *et al.*, 2006).

2.2. *Achromobacter*

A ce jour, le genre *Achromobacter* comprend 7 espèces (<http://www.bacterio.cict.fr>) dont une prédomine en pathologie humaine, *A. xylosoxidans*. Bien qu'à l'origine de diverses infections, cette bactérie est surtout connue comme pathogène opportuniste respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose (De Baets *et al.*, 2007). Les systèmes d'efflux impliqués dans la résistance aux antibiotiques de cette bactérie sont encore mal connus, en dehors de AxyABM et AxyXY-OprZ (Bador *et al.*, 2011; Bador *et al.*, 2013) (**Figure 13**) (**Tableau 6**).

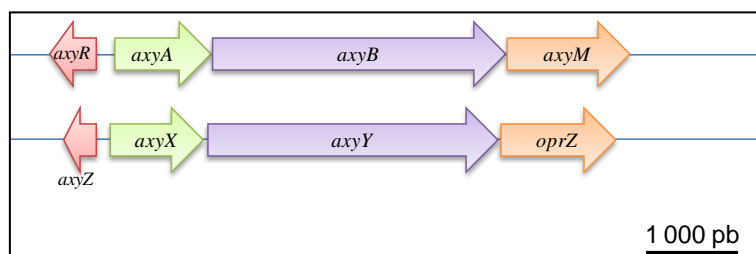


Figure 13. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de *A. xylosoxidans* impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

Les gènes déterminant les différents constituants de la pompe d'efflux sont représentés en vert (la protéine adaptatrice), en violet (le transporteur RND) et en orange (la protéine de membrane externe). Les gènes situés en amont de ces opérons codent pour des répresseurs transcriptionnels potentiels.

Tableau 6. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de *A. xylosoxidans*.

Nom du système	Famille du transporteur	Substrats pris en charge	Contribution à la résistance		
			naturelle	acquise	souches cliniques
AxyABM	RND	ATM, CAZ, CEP, CFM, CTR, CTT, CTX, FOX, CIP, LVX, NAL, NOR, OFX, CHL	oui	nd	nd
AxyXY-OprZ	RND	CAZ, DOR, FEP, IPM, MEM, AMK, GEN, KAN, NET, TOB, ERY, CIP, LVX, MXF, NAL, NOR, DOX, TET, TGC, CHL	oui	nd	oui

nd : non déterminé.

2.2.1. Contribution de l'efflux dans la résistance naturelle de *A. xylosoxidans*

Les deux systèmes RND décrits participent à la résistance naturelle de la bactérie aux antibiotiques. AxyABM est codé par l'opéron *axyABM* dans lequel *axyA* code pour la protéine de fusion, *axyB* pour le transporteur de la famille RND et *axyM* pour la protéine de membrane externe. L'inactivation de *axyB* chez une souche clinique sensible a établi l'implication du système dans la résistance naturelle de l'espèce aux céphalosporines (2 à ≥ 16 fois) (hormis le céfépime), l'aztréonam (>16 fois), les fluoroquinolones (2 à 4 fois) et le chloramphénicol (2 fois) (Bador *et al.*, 2011).

AxyXY-OprZ est codé par une structure opéronique où *axyX* code pour la protéine de fusion, *axyY* pour le transporteur et *oprZ* pour la protéine de membrane externe. Le rôle de cette pompe dans la résistance naturelle a été évalué *via* l'inactivation de *axyY* chez un isolat clinique de phénotype sauvage. Les résultats démontrent qu'elle contribue à la résistance aux aminosides (8 à 128 fois), aux β -lactamines (2 à 4 fois), aux tétracyclines (2 à 4 fois), aux fluoroquinolones (2 fois), au chloramphénicol (2 fois) et à l'érythromycine (4 fois) (Bador *et al.*, 2013).

2.2.2. Mutations et résistance acquise

A ce jour aucune étude ne rapporte la sélection de mutants spontanés *in vitro* sélectionnés à partir de souches de *A. xylosoxidans*.

2.2.1. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches cliniques

Seul le système AxyXY-OprZ a été inactivé chez des souches cliniques MDR. Sa suppression chez deux isolats a conduit à une diminution de la résistance aux substrats cités précédemment dont l'amikacine (512 fois). Ces différences importantes laissent à penser que l'opéron *axyXY-OprZ* était initialement surexprimé chez ces bactéries (**Tableau 7**) (Bador *et al.*, 2013). A notre connaissance, aucune mutation affectant les gènes régulateurs potentiels (*axyR* et *axyZ*) situés respectivement en amont des deux opérons *axyABM* et *axyXY-OprZ*, n'a été décelée chez des mutants isolés de patients (Bador *et al.*, 2011) (Bador *et al.*, 2013).

Tableau 7. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches cliniques de *A. xylosoxidans*.

Antibiotiques	MDR1/ Δ <i>axyY</i> ^a	MDR2/ Δ <i>axyY</i> ^a
CAZ	2	2
DOR	1	8
FEP	>8	nd
IPM	2	4
MEM	2	8
AMK	512	64
GEN	128	64
KAN	>64	16
NET	64	256
TOB	64	32
ERY	>32	nd
CIP	>8	>4
LVX	4	>4
MXF	>16	nd
NOR	>8	>2
DOX	4	4
TET	>8	nd
TGC	8	4

^a Les chiffres représentent la diminution, en nombre de fois de la CMI, de la résistance consécutive à l'inactivation du système d'efflux chez 2 souches cliniques de phénotype MDR (MDR1, MDR2). nd : non déterminé. Adapté de (Bador *et al.*, 2013).

2.3. Burkholderia

Le genre *Burkholderia* a été proposé en 1992 suite à la redéfinition du genre *Pseudomonas* sur la base d'analyses comparatives de l'ARNr (Yabuuchi *et al.*, 1992). Parmi les 72 espèces recensées (<http://www.bacterio.cict.fr/>), *B. pseudomallei* et les bactéries du complexe *cepacia* sont les pathogènes humains les plus significatifs. *B. pseudomallei* est

l'agent de la mélioïdose (Wiersinga *et al.*, 2006), une infection sévère endémique en Asie du sud-est, au nord de l'Australie ainsi que dans certaines régions tropicales (Currie *et al.*, 2008). Du fait de sa résistance élevée aux antibiotiques et de la mortalité qui lui est associée, cette bactérie est considérée comme un agent potentiel de bioterrorisme. *B. cenocepacia*, *B. multivorans* et *B. vietnamiensis* sont, en revanche, des pathogènes pulmonaires occasionnels chez les patients atteints de mucoviscidose (Lynch, 2009). Chez ces malades, la colonisation bronchique par ces espèces peut s'avérer délétère. Le potentiel épidémique et la résistance élevée de certaines souches contraignent à une surveillance épidémiologique constante (Observatoire *Cepacia*).

Les pompes d'efflux chez *Burkholderia* ont été étudiées par plusieurs équipes. Trois des 10 systèmes RND potentiels identifiés chez *B. pseudomallei* (AmrAB-OprA, BpeAB-OprB et BpeEF-OprC) et 5 des 16 systèmes identifiés chez *B. cenocepacia* (CeoAB-OpcM, RND2 RND3, RND4 et RND9) semblent être impliqués dans la résistance aux antibiotiques (**Figure 14**) (**Tableau 8**). Un transporteur MFS chez *B. cenocepacia* pourrait également jouer un rôle dans ce domaine.

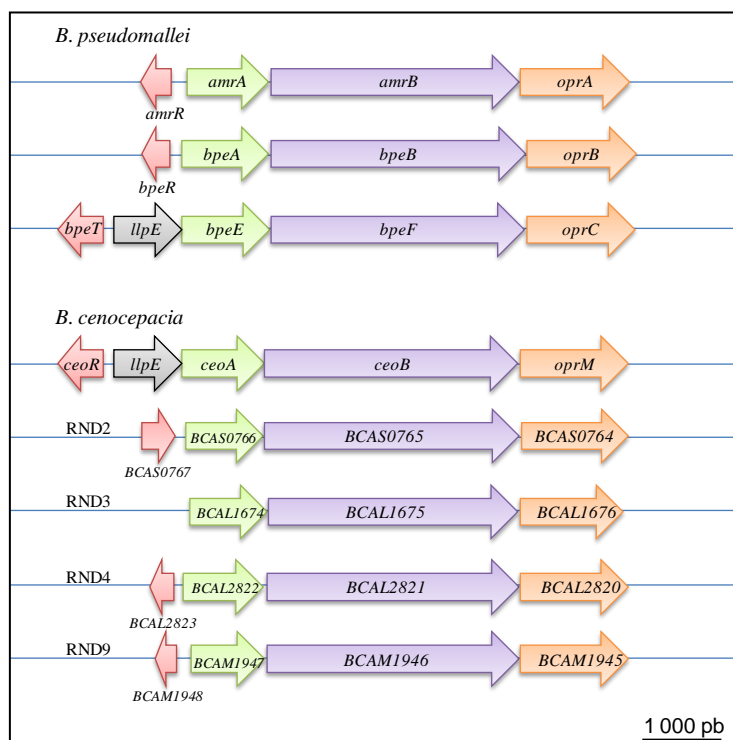


Figure 14. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de *Burkholderia* impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

Les gènes déterminant les différents constituants de la pompe d'efflux sont représentés en vert (la protéine adaptatrice), en violet (le transporteur RND) et en orange (la protéine de membrane externe). Les gènes situés en amont de ces opérons codent pour des répresseurs transcriptionnels (rouge). Les gènes codant des protéines de fonction indéterminée sont représentés en noir.

Tableau 8. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de *Burkholderia*.

Organisme	Nom du système	Chromosome impliqué	Famille du transporteur	Substrats pris en charge	Contribution à la résistance		
					naturelle	acquise	souches cliniques
<i>B. pseudomallei</i> (2 chromosomes)	AmrAB-OprA	1	RND	GEN, KAN, NEO, SPT, STR, TOB, CET, CLI, CLR, ERY, DOX, TET	oui	oui	oui
	BpeAB-OprB	1	RND	(CAZ) ^e , GEN, (SPT) ^e , STR, CLI, (CLR) ^e , (ERY) ^e , CIP, NOR, DOX, (TET) ^e , (CHL) ^e	oui	nd	nd
	BpeEF-OprC ^a	2	RND	CHL, TMP	nd	nd	oui
<i>B. cenocepacia</i> (3 chromosomes)	CeoAB-OpcM ^{a,b}	2	RND	CIP, CHL, TMP	nd	nd	nd
	RND2	3	RND	STR, CIP, NAL, NOR, OFX	nd	nd	nd
	RND3 ^c	1	RND	(GEN) ^e , KAN, (TOB) ^e , NAL, TET	oui	nd	nd
	RND4 ^d	1	RND	ATM, GEN, TOB, CIP, LVX, NAL, NOR, SPX, CHL	oui	nd	nd
	RND9	2	RND	ATM, TOB, LVX, SPX	oui	nd	nd
	BcrA ^a	1	MFS	NAL, TET	nd	nd	nd

^a Système non exprimé et non inactivé chez une souche sauvage. ^b Homologue de BpeEF-OprC. ^c Homologue de AmrAB-OprA. ^d Homologue de BpeAB-OprB. ^e Résultats divergeants d'après les diverses données de la littérature. nd : non déterminé.

2.3.1. Contribution de l'efflux dans la résistance naturelle des *Burkholderia*

Des arguments expérimentaux suggèrent que AmrAB-OprA et BpeAB-OprB participent à la résistance intrinsèque de *B. pseudomallei*, RND3, RND4 et RND9 à celle de *B. cenocepacia*. Ainsi, il a été noté que l'inactivation du système AmrAB-OprA chez une souche sauvage (J2315) augmentait la sensibilité de celle-ci aux aminosides, aux macrolides et aux tétracyclines (Mima and Schweizer, 2010) (Mima *et al.*, 2011) (Choi *et al.*, 2008) (Moore *et al.*, 1999) (Trunck *et al.*, 2009) (**Tableau 9**).

Les substrats transportés par la pompe BpeAB-OprB ne sont pas aussi clairement définis. En effet, l'inactivation génétique de ce système chez deux souches sauvages différentes (1026b et KHW) a conduit à des résultats divergents. Mima et Schweizer sont parvenus à la conclusion que, contrairement à ce qui avait été rapporté chez la souche KHW (Chan *et al.*, 2004), le système BpeAB-OprB ne transporte pas ou peu les aminosides et les macrolides chez la souche 1026b (Mima and Schweizer, 2010) (**Tableau 9**). Les fluoroquinolones, les tétracyclines, le chloramphénicol et la ceftazidime seraient en revanche des substrats de cette pompe. L'origine de cette discordance n'a pas été déterminée. Toutefois, il est à noter que des différences importantes dans la séquence des protéines BpeA et OprB existent entre KHW et 6 autres souches de *B. pseudomallei* (dont 1026b).

L'inactivation du système RND3 chez *B. cenocepacia* a, elle aussi, donné lieu à des résultats contradictoires. Burroni *et al.* ont montré que RND3 était impliqué dans la résistance de la souche sauvage J2315 à l'acide nalidixique (Burroni *et al.*, 2009) alors que Hamad *et al.* lui ont attribué un rôle essentiel dans l'efflux des aminosides (Hamad *et al.*, 2010) (**Tableau 9**). Comme pour le système BpeAB-OprB, la cause de ces discordances reste inexpliquée.

L'inactivation du système RND9 a, quant à elle, été associée à une diminution modérée (2 fois) de la résistance à la tobramycine, la lévofloxacine, la sparfloxacine et l'aztréonam, tandis que celle du système RND4 entraîne une sensibilité à tous les antibiotiques testés (**Tableau 9**). Curieusement, le double mutant $\Delta rnd4-rnd9$ s'est avéré présenter le même profil de sensibilité que celui du simple mutant $\Delta rnd4$, comme si l'absence de RND9 était compensée par un autre système (Bazzini *et al.*, 2011) (**Tableau 9**).

Par des expériences de RT-PCR, Guglierame *et al.* ont montré que le système RND2 n'était pas exprimé chez la souche sauvage J2315 dans les conditions de culture utilisées. Ces résultats n'excluent pas cependant pas la possibilité d'une participation de RND2 à la

résistance naturelle car certains systèmes sont induits par les antibiotiques qu'ils transportent comme, par exemple, MexXY/OprM (Gugliera *et al.*, 2006) (Jeannot *et al.*, 2005).

2.3.1. Mutations et résistance acquise

Plusieurs études ont rapporté l'obtention de mutants résistants surproducteurs de pompes d'efflux chez *Burkholderia* mais, à ce jour, les mutations en cause n'ont pas été caractérisées. Des mutants surexprimant l'opéron *amrAB-oprM* ont été sélectionnés sur un milieu supplémenté en céthromycine ; le gène adjacent *amrR* codant un régulateur du système appartenant à la famille TetR était toutefois exempt de mutations chez ces bactéries. Ces résultats indiquent clairement que l'opéron *amrAB-oprA* est sous le contrôle d'autre(s) système(s) de régulation, à l'origine de la surexpression (Mima *et al.*, 2011). Une équipe russe, quant à elle, s'est intéressée aux mécanismes par lesquels les souches de *Burkholderia* développent des hauts niveaux de résistance aux fluoroquinolones et à la ceftazidime (Viktorov *et al.*, 2008). Pour cela, différents types de mutants ont été sélectionnés par entraînements successifs sur gradients de péfloxacin (PEF) et/ou ofloxacin (OFX) et/ou ceftazidime (CAZ) à partir d'isolats sauvages de *B. pseudomallei*, *B. mallei* et *B. thailandensis*. Ainsi, six mutants ont été obtenus : *B. pseudomallei* (PEF/CAZ, CAZ/PEF, OFX/CAZ), *B. mallei* (PEF, CAZ) et *B. thailandensis* (PEF/CAZ). Des expériences de RT-PCR ont mis en évidence une surexpression du gène *amrB* chez les 2 mutants de *B. pseudomallei* CAZ/PEF et OFX/CAZ par rapport à la souche parentale initiale. De leur côté, Biot *et al.* ont étudié l'adaptation de *B. thailandensis* à des concentrations croissantes de chloramphénicol. Les caractères biochimiques et génétiques de cette bactérie étant proches de ceux de *B. pseudomallei* et *B. mallei*, cette espèce constitue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes de résistance des *Burkholderia* très pathogènes (classe III). Des variants résistants au chloramphénicol, aux quinolones et aux tétracyclines ont ainsi été obtenus. Leur caractérisation par une étude protéomique a démontré qu'ils surproduisaient des systèmes d'efflux homologues à BpeAB-OprB et BpeEF-OprC de *B. pseudomallei*. Cependant, le caractère instable de ces variants suggère que la surproduction des systèmes est le fruit d'un phénomène d'induction plutôt que de mutations (Biot *et al.*, 2011).

Tableau 9. Conséquence de l'inactivation des différents systèmes d'efflux de *Burkholderia* sur la résistance de souches sauvages.

Antibiotiques	<i>B. pseudomallei</i>				<i>B. cenocepacia</i>				
	1026b	1026b	KHW ^b	1026b	J2315	K56-2	J2315 ^b	J2315 ^b	J2315 ^b
	$\Delta amrAB-oprA^a$	$\Delta bpeAB-oprB^a$		$\Delta amrAB-oprA, \Delta bpeAB-oprB^a$	$\Delta rnd3^a$		$\Delta rnd4^a$	$\Delta rnd9^a$	$\Delta rnd4, \Delta rnd9^a$
ATM	nd	nd	nd	nd	1	nd	8	2	8
CAZ	1	2	1	1	nd	nd	nd	nd	nd
GEN	128,256,128,256	2	1024	256	>128,1	>128	2	1	2
KAN	32,>16,16	1	nd	16	>16	>16	nd	nd	nd
NEO	>8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SPT	8,>16,32	2	1	32	nd	nd	nd	nd	nd
STR	64,>128	>1	1024	>128	nd	nd	nd	nd	nd
TOB	64	nd	nd	nd	64,1	64	4	2	4
CET	2-4	nd	nd	16-32	nd	nd	nd	nd	nd
CLI	>1	>2	nd	>32	nd	nd	nd	nd	nd
CLR	16,16,>32,16	2	1	256	nd	nd	nd	nd	nd
ERY	16,16,32,>32,16	1	1024	256	nd	nd	nd	nd	nd
CIP	1	2	nd	16	1	nd	4	1	4
LVX	nd	nd	nd	nd	1	nd	8	2	8
NAL	nd	nd	nd	nd	8	nd	4	1	16
NOR	1,1	2	nd	16	1	nd	4	1	4
OFX	1	1	1	16	nd	nd	nd	nd	nd
SPX	nd	nd	nd	nd	1	nd	8	2	8
DOX	2	4	nd	32	nd	nd	nd	nd	nd
TET	2,2	2	1	16	4	4	nd	nd	nd
CHL	1,1	2	1	4	1,1	nd	4	1	4

^a Les chiffres représentent la diminution, en nombre de fois de la CMI, de la résistance consécutive à l'inactivation du système d'efflux chez différentes souches sauvages. nd : non déterminé. Adapté de (Mima *et al.*, 2011) (Trunck *et al.*, 2009) (Choi *et al.*, 2008) (Moore *et al.*, 1999; Mima and Schweizer, 2010) ^b(Chan *et al.*, 2004) (Buroni *et al.*, 2009) (Hamad *et al.*, 2010) ^b(Bazzini *et al.*, 2011).

2.3.2. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches cliniques

Il n'existe, dans la littérature, que peu de données sur les mécanismes de résistance des souches cliniques de *Burkholderia*. Un travail réalisé sur une collection de 65 souches de *B. pseudomallei* a démontré que 18 isolats exprimaient *amrB* à un niveau égal ou supérieur à celui de la souche 1026b alors que le gène *bpeB* n'était, quant à lui, surexprimé dans aucune des souches. Néanmoins, aucune corrélation n'a pu être faite entre la surexpression du gène *amrB* et la résistance aux antibiotiques étudiés (ceftazidime, doxycycline et méropénème) (Kumar *et al.*, 2008). D'après Trunck *et al.*, la sensibilité anormale aux aminosides et aux macrolides de certaines souches cliniques serait à rattacher à la délétion ou à la sous-expression de l'opéron *amrAB-oprA* (Trunck *et al.*, 2009).

Le rôle joué par le système BpeEF-OprC n'est, à ce jour, pas clairement démontré chez les isolats provenant de patients. Une étude rapporte l'isolement d'un couple isogénique où l'un des partenaires plus résistant au chloramphénicol, à l'ofloxacine et au cotrimoxazole présentait une délétion de 800 kb incluant une partie du gène *bpeT*, lequel code pour un potentiel répresseur du système (Hayden *et al.*, 2012). Une étude portant sur 31 souches du complexe *B. cepacia* (CF, non CF et environnementales) a trouvé que seules 50% des isolats de *B. cenocepacia* contenait l'un ou l'autre des 4 gènes de l'opéron (*ceoAB-opcM*, *llpE*) ainsi que *ceoR* qui code pour un régulateur potentiel de la famille LysR, sans corrélation avec les niveaux de résistance au chloramphénicol, au triméthoprim et à la ciprofloxacine (Nair *et al.*, 2004).

2.3.3. Systèmes d'efflux dont la contribution à la résistance aux antibiotiques n'a pas été démontrée chez *Burkholderia*

Le système RND CeoAB-OpcM a été identifié par criblage d'une banque de cosmides générée à partir de l'ADN génomique d'un isolat clinique CF de *B. cenocepacia* (Nair *et al.*, 2004). Il est codé par une structure opéronique particulière contenant, en plus des gènes *ceoA*, *ceoB* et *opcM*, un gène nommé *llpE* situé en amont de *ceoA*, codant pour une « *lipase-like protein* » périplasmique. Le transfert du cosmide contenant les 4 gènes de l'opéron (*CeoAB-OpcM*, *llpE*) dans une souche sensible de *B. multivorans* a conduit à une augmentation de la résistance au chloramphénicol (8 fois), au triméthoprim (8 fois) et à la ciprofloxacine (8 fois), sans modification des CMI de la gentamicine et de la ceftazidime. Il est à noter que les

mêmes niveaux de résistance ont été obtenus par clonage et surexpression des gènes *ceoAB-opcM*, indiquant que LlpE n'est pas nécessaire au fonctionnement de la pompe dans les conditions de culture utilisées. Aucun élément ne permet donc de savoir si ce système contribue à la résistance de *B. cenocepacia* aux antibiotiques.

Une approche consistant à intégrer un mini-Tn7 portant les gènes *bpeEF-oprC* d'une souche de *B. pseudomallei* dans le chromosome de *P. aeruginosa*, privée des gènes codant ses principales pompes d'efflux RND ($\Delta mexAB-oprM$, $\Delta mexCD-oprJ$, $\Delta mexEF-oprN$, $\Delta mexJK$, $\Delta mexXY$ et $\Delta opmH$) a montré que le système conférait une résistance au chloramphénicol et au triméthoprim (Kumar *et al.*, 2006). Néanmoins, son inactivation reste à effectuer chez *B. pseudomallei* afin de démontrer son implication dans le phénotype de sensibilité aux antibiotiques de l'espèce.

Le gène *rnd2* a été cloné et exprimé chez une souche sensible de *E. coli*. par comparaison avec la souche parentale, la surproduction de cette pompe s'est accompagnée d'une résistance plus forte à la streptomycine (16 fois), l'acide nalidixique (4 fois), la ciprofloxacine (4 fois), l'ofloxacine (2 fois) et la norfloxacine (2 fois). Là aussi, on ignore si ce système participe à la résistance aux antibiotiques chez *B. cenocepacia* (Guglielame *et al.*, 2006).

BcrA est un système appartenant à la famille MFS des transporteurs à 14 segments transmembranaires. La surexpression du gène correspondant chez *E. coli* s'est trouvée associée à une plus forte résistance de la souche à la tétracycline (4 fois) et à l'acide nalidixique (8 fois) (Wigfield *et al.*, 2002). Sa fonction chez *B. cepacia* reste, là encore, hypothétique. Deux régulateurs potentiels de BcrA ont été identifiés. L'un, codé par un gène localisé en aval de *bcrA*, code pour une protéine de type LysR et un second, en amont du gène *bcrA*, un régulateur de la famille Mar. L'un ou l'autre (ou peut être les deux) pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'expression de *bcrA*.

2.4. *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia est un pathogène nosocomial impliqué dans diverses infections aiguës ou chroniques, comme par exemple des bactériémies sur cathéter et des pneumonies acquises sous ventilation mécanique (Senol, 2004). Une colonisation de l'arbre trachéo-bronchique a été observée chez 13% des patients atteints de mucoviscidose (Goss *et al.*, 2004). Cependant, l'impact clinique de cette colonisation est controversé (Hadjiliadis *et al.*, 2007). L'existence de souches plus pathogènes au sein de l'espèce a été évoquée

(Ribbeck-Busch et al., 2005) (Berg et al., 1999). Un groupe phylogénétique appelé groupe A, regroupant environ la moitié des souches cliniques, serait plus apte à engendrer des infections (Gould et al., 2006). Le séquençage génomique complet de la souche K279a, appartenant au groupe A, a révélé la présence de 9 systèmes d'efflux de la famille RND dont 5 seulement ont été caractérisés. Un système d'efflux de type ABC a également été identifié (Crossman *et al.*, 2008) (**Tableau 10**) (**Figure 15**).

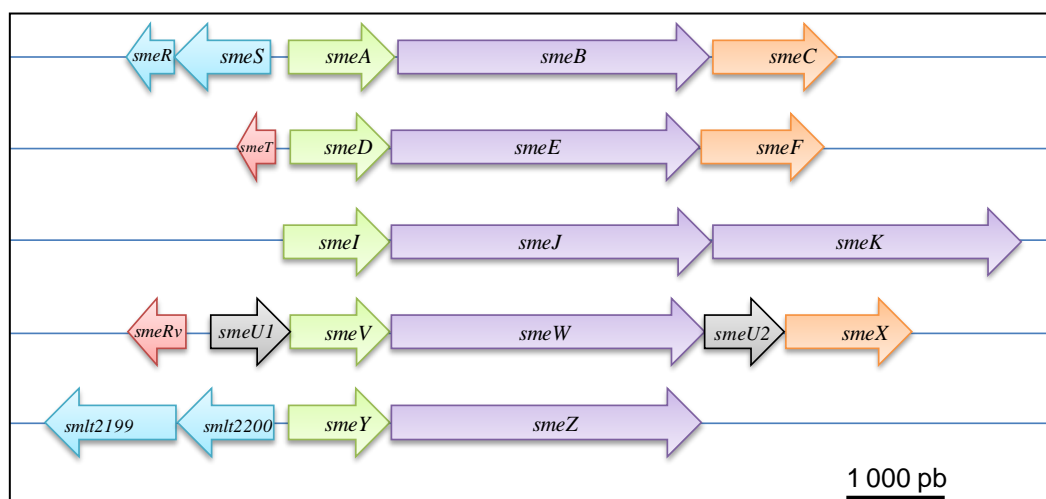


Figure 15. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de *S. maltophilia* impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

Les gènes déterminant les différents constituants de la pompe d'efflux sont représentés en vert (la protéine adaptatrice), en violet (le transporteur RND) et en orange (la protéine de membrane externe). Les gènes situés en amont de ces opérons codent pour des régulateurs potentiels : répresseurs transcriptionnel (rouge) et système à deux composants (bleu). Les gènes codant des protéines de fonction indéterminée sont représentés en noir.

Tableau 10. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de *S. maltophilia*.

Nom du système	Famille du transporteur	Substrats pris en charge	Contribution à la résistance		
			naturelle	acquise	souches cliniques
SmeABC	RND	AMP, CAR, CEF, CFP, CPO, CTX, FEP, PEN, AMK, GEN, KAN, STR, TOB, CIP, NAL, NOR, TVA, TET, CHL, TMP	non	oui	oui
SmeDEF	RND	AMP, CAR, CEF, CFP, CPO, CTX, FEP, MEM, PEN, PIP, KAN, AZM, ERY, CFN, CIP, GEM, MXF, NAL, NOR, NOV, TVA, DOX, MIN, TET, TGC, CHL, RIF, TMP	oui	oui	oui
SmeIJK	RND	AMK, GEN, CIP, MIN, TET	oui	nd	nd
SmeVWX	RND	MXF, NAL, DOX, TET, CHL	non	oui	nd
SmeYZ	RND	AMK, GEN, KAN, TOB	oui	nd	nd
SmrA	ABC	CIP, NOR, OFX, TET	nd	nd	nd

nd : non déterminé.

2.4.1. Contribution de l'efflux dans la résistance naturelle de *S. maltophilia*

Trois des cinq systèmes d'efflux de type RND actuellement caractérisés contribuent à la résistance naturelle de la bactérie aux antibiotiques (**Tableau 11**). Les pompes SmeABC et SmeVWX n'y participent pas puisque leur inactivation chez une souche sauvage ne modifie pas les niveaux de sensibilité (Li *et al.*, 2002) (Chen *et al.*, 2011).

SmeDEF a été le premier système identifié chez *S. maltophilia* (Alonso and Martinez, 2000). par RTq-PCR, Zhang *et al.* ont, dans un premier temps, démontré que les trois gènes codant l'opéron *smeDEF* étaient exprimés chez une souche de phénotype sauvage (ULA-511). Puis, consécutivement à l'inactivation des gènes *smeE* ou *smeF*, ces auteurs ont observé une augmentation de la sensibilité aux quinolones, aux tétracyclines, aux macrolides, au chloramphénicol et à la novobiocine indiquant que le système était impliqué dans la résistance naturelle de la bactérie. En raison des hauts niveaux de résistance des souches sauvages aux β -lactamines, la même démarche a été entreprise chez la souche ULA-511 privée des gènes codant les β -lactamases L1 et L2 (K1449) (Zhang *et al.*, 2001) (**Tableau 11**). Les mutants Δ *smeDEF* ainsi obtenus sont apparus légèrement plus sensibles (2 fois) à certaines β -lactamines (carbénicilline, pipéracilline, céfopérazone, céfépime et cefpirome) que ceux de la souche ULA-511.

Les systèmes SmeYZ et SmeIJK ont été étudiés chez la souche de *S. maltophilia* K279a phylogénétiquement très proche de ULA-511 (Gould *et al.*, 2004). Une forte augmentation de sa sensibilité aux aminosides a été notée suite à l'inactivation du gène *smeZ*, tandis que l'effet plus modeste de la délétion de *smeJ* et/ou *smeK* portait également sur les fluoroquinolones et les tétracyclines (Crossman *et al.*, 2008) (**Tableau 11**).

Tableau 11. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance naturelle des souches de *S. maltophilia*.

Antibiotiques	K1449	K29a	
	WT/ Δ <i>smeDEF</i> ^{a,b}	WT/ Δ <i>smeJK</i> ^{a,c}	WT/ Δ <i>smeZ</i> ^{a,c}
AMP	1-2	nd	nd
ATM	nd	(2)	(2)
CAR	2	nd	nd
CAZ	nd	1	1
CEF	1-2	nd	nd
CFP	2	nd	nd
CPO	2	nd	nd
CTX	1-2	nd	nd
FEP	2	nd	nd
IPM	1	1	1
MEM	2	1	1
PEN	1-2	nd	nd
PIP	2	1	1
PIR	1	nd	nd
AMK	nd	2	2
GEN	nd	2	16
KAN	1-2	1	2
TOB	nd	1	2
AZM	1	nd	nd
ERY	4	1	1
CFN	4	nd	nd
CIP	4	2	1
GEM	4	nd	nd
LVX	nd	1	1
MXF	4-8	nd	nd
NAL	2	nd	nd
NOR	4	1	1
NOV	2	nd	nd
TVA	2	nd	nd
DOX	2	nd	nd
MIN	2	2	1
TET	4	2	1
TGC	2-4	nd	nd
CHL	2	1	1
RIF	1	nd	nd
SMX	nd	1	1
TMP	1-2	1	1

^a Les valeurs représentent la diminution ou (l'augmentation), en nombre de fois la CMI, de la résistance consécutive à l'inactivation du système chez des souches sauvages. K1449 : ULA-511 Δ *bla*_{L1} Δ *bla*_{L2}. K29a et ULA-511 : souches sauvages. nd : non déterminé. WT (*Wild Type*) : sauvage. Adapté de ^b(Zhang *et al.*, 2001), ^c(Crossman *et al.*, 2008).

2.4.2. Mutations et résistance acquise

Un mutant MDR surproducteur du système SmeABC a été sélectionné sur un milieu renfermant de la ciprofloxacine et du cefsulodin à partir de la souche β -lactamase négative K1449 (Li *et al.*, 2002). La double délétion des gènes *smeB* et *smeC*, chez cette souche, a entraîné une diminution de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones (**Tableau 12**). Cependant, l'effet observé a été attribué à la perte de la protéine de membrane externe SmeC et non à celle du transporteur SmeB, la délétion du gène *smeB* seule n'ayant aucun impact sur les niveaux de résistance. Ces résultats suggèrent que la structure tripartite composée des protéines SmeA, SmeB et SmeC n'est pas capable de prendre en charge les antibiotiques, et que SmeC peut s'associer à d'autres partenaires. Les auteurs ont, par ailleurs, montré que la résistance aux β -lactamines observée était due en réalité à une activité β -lactamase et non pas à un mécanisme d'efflux impliquant SmeC. Il est intéressant de noter que l'expression de l'opéron *smeABC* est régulée par un système à deux composants situé juste en amont, appelé SmeSR. Cependant, la surexpression de *smeABC* chez le mutant MDR ne résulte pas de l'altération des gènes codant SmeSR ou de la région intergénique *smeS-smeA*. Il faut donc envisager l'existence d'autres mécanismes de régulation (Li *et al.*, 2002).

Par des expériences de RTq-PCR, Zhang *et al.* ont montré qu'un mutant MDR sélectionné *in vitro* sur ciprofloxacine surexprimait les gènes codant le système SmeDEF (Zhang *et al.*, 2001). L'inactivation du gène codant la protéine de membrane externe SmeF mais pas de celui du transporteur SmeE a permis de réverter le phénotype de résistance du mutant (**Tableau 12**). A l'instar du système SmeABC, SmeDEF ne semble pas capable « d'effluer » les antibiotiques, SmeF devant probablement s'associer avec d'autres partenaires protéiques que SmeDE pour former une structure tripartite fonctionnelle. Un autre mutant surproduisant le système SmeDEF a été sélectionné *in vitro* sur tétracycline, le séquençage du gène *smeT* situé en amont de l'opéron *smeDEF* a révélé la présence d'une variation d'acide aminé (L₁₆₆Q) dans le répresseur SmeT appartenant à la famille TetR (Alonso and Martinez, 1997) (Sanchez *et al.*, 2002a). Des mutants d'efflux présentant une séquence d'insertion (IS) dans la région intergénique *smeT-smeD* ont été rapportés, par ailleurs (Sanchez *et al.*, 2002a) (Gould and Avison, 2006). Néanmoins, certains mutants obtenus *in vitro* présentent un gène *smeT* ainsi qu'une région intergénique *smeT-smeD* intacts (Gould and Avison, 2006).

Tableau 12. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance acquise des souches de *S. maltophilia*.

Antibiotiques	K1449	ULA-511	KJ
	SmeABC ⁺⁺ / <i>AsmeBC</i> ^{a,b}	SmeDEF ⁺⁺ / <i>AsmeF</i> ^{a,c}	SmeVWX ⁺⁺ / <i>AsmeU1VWU2X</i> ^{a,d}
AMP	64-128	nd	nd
CAR	64	nd	nd
CEF	32	nd	nd
CFP	4	nd	nd
CPO	2	nd	nd
CTX	8	nd	nd
FEP	4	nd	nd
IPM	1	nd	nd
PEN	16	nd	nd
AMK	>2	nd	nd
GEN	>4	nd	(4)
KAN	8	2	(4)
STR	>8	nd	nd
TOB	>1	nd	(2)
AZM	nd	2	nd
ERY	1	2	nd
CFN	nd	8	nd
CIP	2-4	8	nd
GEM	nd	8	nd
MXF	nd	4	2
NAL	2-4	16	32
NOR	2-4	8	nd
NOV	nd	2	nd
TVA	4	16	nd
DOX	nd	8	2
MIN	nd	4	nd
TET	1-2	8	4
TGC	nd	8	nd
CHL	2-4	2	16
RIF	nd	2	nd
TMP	2	2	nd

^a Les valeurs représentent la diminution ou (l'augmentation), en nombre de fois la CMI, de la résistance consécutive à l'inactivation du système chez une souche surproductrice (++) . K1449 : ULA-511 $\Delta bla_{L1} \Delta bla_{L2}$. ULA-511 et KJ : souches sauvages. nd : non déterminé. D'après ^b(Li *et al.*, 2002), ^c(Zhang *et al.*, 2001) et ^d(Chen *et al.*, 2011)

La caractérisation d'un mutant sélectionné sur chloramphénicol à partir de la souche sauvage KJ a révélé la surexpression d'un autre système d'efflux de type RND, dénommé SmeVWX (Chen *et al.*, 2011). L'opéron codant ce système a la particularité d'être composé de 5 gènes (*smeU1*, *smeVWX*, *smeU2*). Aux trois gènes codant les constituants de la pompe s'ajoutent les gènes *smeU1* et *smeU2* dont les produits s'apparentent à la famille des déshydrogénases/réductases à courte chaîne. Ce mutant se caractérise par une résistance

élevée au chloramphénicol, aux quinolones et aux tétracyclines associée à une hypersensibilité aux aminosides (**Tableau 12**). Des expériences d'inactivation de gène ont établi que cet état d'hypersensibilité était dû à la surexpression de *smeX* et non à celle de *smeVW*. A ce jour, le rôle joué par *SmeX* dans ce phénotype demeure obscure. Contrairement à *SmeU1*, *SmeU2* est associée à une résistance modeste au chloramphénicol, aux quinolones et à la tétracycline. Là encore, le rôle de la protéine *SmeU2* dans le processus d'efflux médié par *SmeVWX* reste incertain. Le séquençage du gène *smeRv* codant le régulateur du système *SmeVWX* et appartenant à la famille LysR n'a pas mis en évidence de mutations chez le mutant.

2.4.3. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches cliniques

Suite à l'identification du système *SmeDEF*, l'équipe de L. Martinez a étudié les niveaux d'expression des gènes codant cette pompe dans une collection de souches cliniques (Alonso and Martinez, 2001). Dans un premier temps, il a été démontré par PCR que le gène *smeD* était présent chez les 15 souches sélectionnées. Puis, la quantification de la protéine *SmeF* par western blotting et quantification des transcrits du gène *smeD* par RTq-PCR a révélé que 7 souches surproduisaient *SmeF* alors que 5 surexprimaient *smeD*, dont 3 avec une surproduction concomitante de *SmeF*. La surexpression du gène *smeD* a été associée à une plus grande résistance des souches à la tétracycline, l'érythromycine, au chloramphénicol et aux quinolones.

Dans une autre étude, 6 souches cliniques sur 30 (20%) surexprimaient significativement les gènes *smeE* et *smeF*. Toutefois, il n'a pas pu être établi de corrélation entre les CMI des antibiotiques substrats de la pompe et les niveaux d'expression de ces gènes (Gould and Avison, 2006). Chez 29/93 autres souches cliniques (31%), le gène *smeF* s'est avéré surexprimé (Chang *et al.*, 2004). La CMI du méropénème était significativement plus importante chez les isolats dont les transcrits du gène *smeF* étaient détectables par RTq-PCR ; 59% des isolats des isolats plus résistants à la ciprofloxacine que les souches sauvages surexprimèrent *smeABC*.

L'équipe de Hsueh comparant 40 isolats MDR à 30 isolats non MDR, a montré que l'expression des gènes *smeA* et *smeD* était plus souvent dérégulée dans le premier groupe que le deuxième (85% vs 33% pour *smeD* et 60% vs 17% pour *smeA*) (Liaw *et al.*, 2010).

Enfin, il a été rapporté que les souches de *S. maltophilia* hautement résistantes aux β -lactamines et aux aminosides surexprimaient fréquemment les gènes *smeB* (63,6%) et *smeF* (57,4%) (Cho *et al.*, 2012). La surexpression de *smeABC* a été associée à des hauts niveaux de résistance à la ciprofloxacine et à la lévofloxacine.

2.4.1. Systèmes d'efflux dont la contribution à la résistance aux antibiotiques n'a pas été démontrée chez *S. maltophilia*

La recherche de systèmes d'efflux appartenant à la famille ABC a identifié le système SmrA. Surexprimé chez *E. coli*, le gène *smrA* confère une résistance aux fluoroquinolones, aux tétracyclines et à la doxycycline. Cependant, son rôle dans la résistance aux antibiotiques chez *S. maltophilia* reste à l'heure actuelle indéterminée (Al-Hamad *et al.*, 2009).

2.5. *Pseudomonas putida*

En raison de sa relative rareté en clinique, de sa faible virulence et de sa sensibilité aux antibiotiques plus importante que celle de *P. aeruginosa*, *P. putida* n'a pas suscité l'intérêt des microbiologistes médicaux travaillant dans le domaine de l'efflux. Par contre, la capacité de certaines souches à croître en présence de toluène a poussé certains scientifiques à caractériser les mécanismes impliqués dans la tolérance aux solvants (Akira inoue, 1989) (Cruden *et al.*, 1992) (Ramos *et al.*, 1995). C'est dans ce cadre, qu'a été découvert la capacité de plusieurs systèmes de type RND (MepABC, TtgABC, TtgGHI) à « effluer » des antibiotiques (**Tableau 13**) (**Figure 16**).

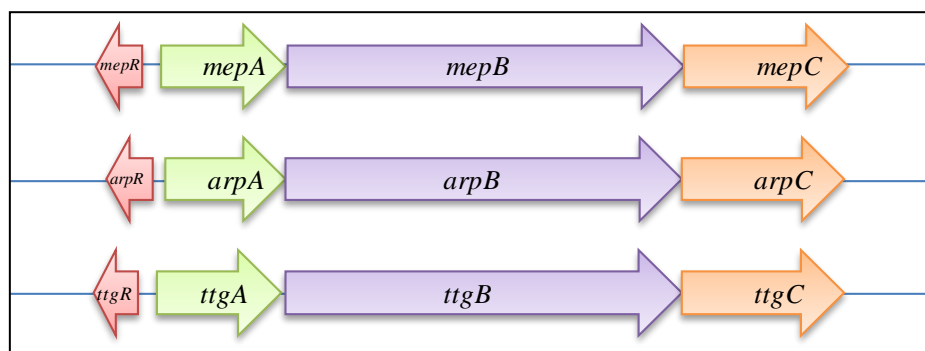


Figure 16. Représentation schématique des systèmes d'efflux RND de *P. putida* impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

Les gènes déterminant les différents constituants de la pompe d'efflux sont représentés en vert (la protéine adaptatrice), en violet (le transporteur RND) et en orange (la protéine de membrane externe). Les gènes situés en amont de ces opérons codent pour des répresseurs transcriptionnels potentiels (rouge).

Tableau 13. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches de *P. putida*.

Nom du système	Famille du transporteur	Substrats pris en charge	Contribution à la résistance		
			Naturelle	acquise	souches cliniques
MepABC	RND	AMP, PEN, ERY, TET, NOV	nd	oui	nd
ArpABC	RND	AMP, CAR, PEN, STR, ERY, NAL, NOV, TET, CHL, PMB, RIF	oui	nd	nd
TtgABC	RND	ATM, FOX, MEM, PIP, CIP, LVX, NAL, TGC, CHL, RIF, SMX	oui	nd	nd
TtgGHI ^a	RND	AMP, CAR, TET	oui	nd	nd

^a Système codé par un plasmide transposable. nd : non déterminé.

2.5.1. Contribution de l'efflux dans la résistance naturelle de *P. putida*

Dans le but d'identifier les mécanismes impliqués dans la tolérance au toluène chez la souche DOT-T1E, Ramos *et al.* ont réalisé une banque d'insertion du transposon mini-Tn5 (Ramos *et al.*, 1998). Parmi les mutants rendus sensibles au toluène, un clone a montré conjointement une diminution de la résistance au chloramphénicol, à l'ampicilline et à la tétracycline. Le site de transposition a été localisé dans le gène *ttgB* codant le transporteur RND d'un système d'efflux, dénommé TtgABC. L'inactivation de ce système a confirmé son implication dans la résistance naturelle de la souche de référence KT2440 à un large éventail d'antibiotiques (Martinez-Garcia and de Lorenzo, 2011) (**Tableau 14**). En revanche, l'inactivation d'une autre pompe (TtgGHI) jouant un rôle important dans la résistance aux solvants n'a pas eu d'effet sur le phénotype sauvage ; le double mutant $\Delta ttgGHI/\Delta ttgABC$ étant plus sensible aux antibiotiques que le simple mutant $\Delta ttgABC$, il semblerait néanmoins que TtgGHI puisse transporter à minima des anti-infectieux (Rojas *et al.*, 2001) (**Tableau 14**). Toutefois, il est à noter que l'opéron codant pour TtgGHI n'est pas situé dans le chromosome de la souche DOT-T1E, mais sur un grand plasmide conjugatif, dénommé pGRT1 et que son transfert à *P. aeruginosa* suffit à cette bactérie pour devenir tolérante aux solvants organiques (Rodriguez-Herva *et al.*, 2007).

En 2001, Kieboom *et al.* ont identifié chez la souche S12 la présence d'un système RND homologue à TtgABC désigné ArpABC (*Antibiotic resistance pump ABC*) impliqué dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques tels que la carbénicilline, la streptomycine, l'érythromycine, la novobiocine, la tétracycline et le chloramphénicol (Kieboom and de Bont, 2001) (**Tableau 14**).

Tableau 14. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance naturelle de *P. putida*.

Antibiotiques	KT2440 ^{a,c}	S12 ^{a,d}	DOT-T1E ^{a,b,e}
	WT/ Δ tgtABC	WT/ Δ arpABC	Δ tgtABC/ Δ tgtABC Δ tgtGHI
AMP	nd	2-4	8
ATM	16	nd	nd
CAR	nd	256	4
FOX	>64	nd	nd
IPM	1	nd	nd
MEM	2	nd	nd
PEN	nd	≥ 2	nd
PIP	32	nd	nd
STR	1	4	nd
TOB	1	nd	nd
ERY	nd	16-32	nd
CIP	2	nd	nd
LVX	4	nd	nd
NAL	4	2	1
NOV	nd	8-16	nd
TET	nd	8-16	4
TGC	2	nd	nd
CHL	4	4	1
PMB	nd	2	nd
RIF	4	2	nd
SMX	16	nd	nd
TMP	1	nd	nd

^a Les chiffres représentent la diminution, en nombre de fois de la CMI, de la résistance consécutive à l'inactivation du système d'efflux. ^b Différence de résistance entre une souche privée du système TgtABC et celle privée de TgtABC et TgtGHI. nd : non déterminé. Adapté de ^c(Martinez-Garcia and de Lorenzo, 2011) ^d(Kieboom and de Bont, 2001) ^e(Rojas *et al.*, 2001).

2.5.2. Mutations et résistance acquise

L'analyse des mécanismes responsables de la résistance aux solvants chez *P. putida* a conduit Fukumori *et al.* à sélectionner *in vitro* et caractériser des mutants résistants au toluène à partir de la souche KT2442 (Fukumori *et al.*, 1998). La résistance accrue de ces derniers à l'ampicilline, la pénicilline, l'érythromycine, la novobiocine et la tétracycline a été abolie par l'inactivation d'un opéron (*mepABC*) codant la pompe RND baptisée MepABC. Cet opéron est précédé en amont par un gène (*mepR*) dont le produit code pour un répresseur potentiel de la famille TetR. La protéine ArpA partageant une identité de séquence de 99,7% avec TgtA et 99,2% avec MepA, on peut se demander si réellement les systèmes ArpABC, TgtABC et MepABC ne sont pas en définitive qu'une seule et même pompe identifiée chez des souches de *P. putida* différentes (S12, DOT-T1E, KT2442, respectivement). Ce fort pourcentage d'homologie se retrouve entre les protéines ArpB, TgtB et MepB ($\geq 99,6\%$). Il en va de même

entre les régulateurs ArpR, TtgR et MepR contrôlant ces systèmes (Kieboom and de Bont, 2001).

2.5.3. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance des souches cliniques

A notre connaissance, aucune étude n'a cherché à mesurer l'expression des gènes d'efflux dans les souches cliniques de *P. putida*. Néanmoins, l'émergence récente de souches de phénotype MDR pourrait justifier des travaux dans ce sens (Kumita *et al.*, 2009).

2.6. *Pseudomonas aeruginosa*

En raison du nombre élevé et de la gravité des infections dont il est à l'origine, le bacille pyocyanique peut être considéré comme un pathogène hospitalier majeur. En France, ce germe opportuniste est responsable de 8,4% de l'ensemble des infections nosocomiales après *Escherichia coli* (26%) et *Staphylococcus aureus* (15,9%) (<http://www.invs.sante.fr>). Il sévit particulièrement dans les unités de soins intensifs, notamment dans les services de réanimation, et constitue l'agent étiologique principal des pneumonies et des infections cutanées. Capable de s'adapter à des environnements variés en raison de son fort potentiel génétique, *P. aeruginosa* joue un rôle majeur dans l'infection broncho-pulmonaire chronique chez les patients atteints de mucoviscidose (Al-Aloul *et al.*, 2004).

En plus de sa virulence particulière dont l'expression dépend de la fragilité des patients, cette espèce se caractérise par une résistance naturelle relativement élevée aux antibiotiques qui peut encore se renforcer grâce à divers mécanismes. Ainsi, les options thérapeutiques peuvent s'avérer très limitées face aux souches MDR, XDR, voire PDR.

Le rôle des systèmes d'efflux dans la résistance aux antibiotiques a été largement étudié chez *P. aeruginosa* (Lister *et al.*, 2009) (Li and Nikaido, 2009) (Morita *et al.*, 2001b). Parmi la quarantaine de systèmes que compte cette bactérie, seul un petit nombre, principalement des transporteurs de type RND, est capable d'exporter des antibiotiques de façon significative (**Tableau 15**).

Tableau 15. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance de *P. aeruginosa*.

Nom du système	Famille du transporteur	Principaux substrats pris en charge	Contribution à la résistance		
			naturelle	acquise	souches cliniques
MexAB-OprM	RND	ATM, CAR, CAZ, CFP, CPO, FEP, MEM, ERY, CIP, LVX, NAL, NOR, NOV, OFX, SPX, TET, CHL, TMP	oui	oui	oui
MexXY	RND	CPO, FEP, AMK, GEN, KAN, STR, ERY, CIP, NOR, OFX, SPX, TET, CHL	oui	oui	oui
MexCD-OprJ	RND	CPO, ERY, CIP, OFX, TET, CHL, TMP	non	oui	oui
MexEF-OprN	RND	CIP, NOR, TET, CHL, TMP	non	oui	oui
MexJK	RND	ERY	nd	oui	oui
MexHI-OpmD	RND	NOV	non	oui	nd
MexVW	RND	CPO, ERY, NOR, OFX, TET, CHL	nd	oui	nd
MexPQ-OpmE	RND	ERY, CIP, NOR, TET, CHL	nd	nd	nd
MexMN	RND	CHL	nd	nd	nd
MuxABC-OpmB	RND	ATM, ERY, NOV	nd	oui	nd
PmpM	MATE	CIP, NOR, OFX	non	nd	nd
EmrE	SMR	GEN, KAN, NEO	oui ^a	nd	nd

^a L'inactivation du système s'est accompagnée d'une diminution de la résistance aux aminosides lorsque les mesures ont été effectuées dans un milieu particulier NB, ce qui n'a pas été le cas avec un milieu MH ou LB. nd : non déterminé.

2.6.1. Organisation des gènes codant les systèmes d'efflux de la famille RND

Dans certains cas, comme par exemple *mexAB-oprM*, les 3 gènes codant les constituants de la structure tripartite sont regroupés en un seul opéron (**Figure 17**). Dans d'autres, comme *mexXY*, l'opéron ne contient que deux gènes, la protéine de membrane externe étant codée par un opéron distinct (*mexAB-oprM*) ou un gène isolé (*opmH*). L'expression des opérons d'efflux est généralement sous le contrôle d'un gène régulateur local codant un répresseur, plus rarement un activateur transcriptionnel. Ces protéines régulatrices possèdent un domaine hélice-tour-hélice (HTH) qui leur permet de se fixer sur des régions promotrices en amont de l'opéron. Il est à noter que l'activité de certains systèmes d'efflux est contrôlée par des réseaux de régulation globaux et intégrés à des réponses physiologiques complexes.

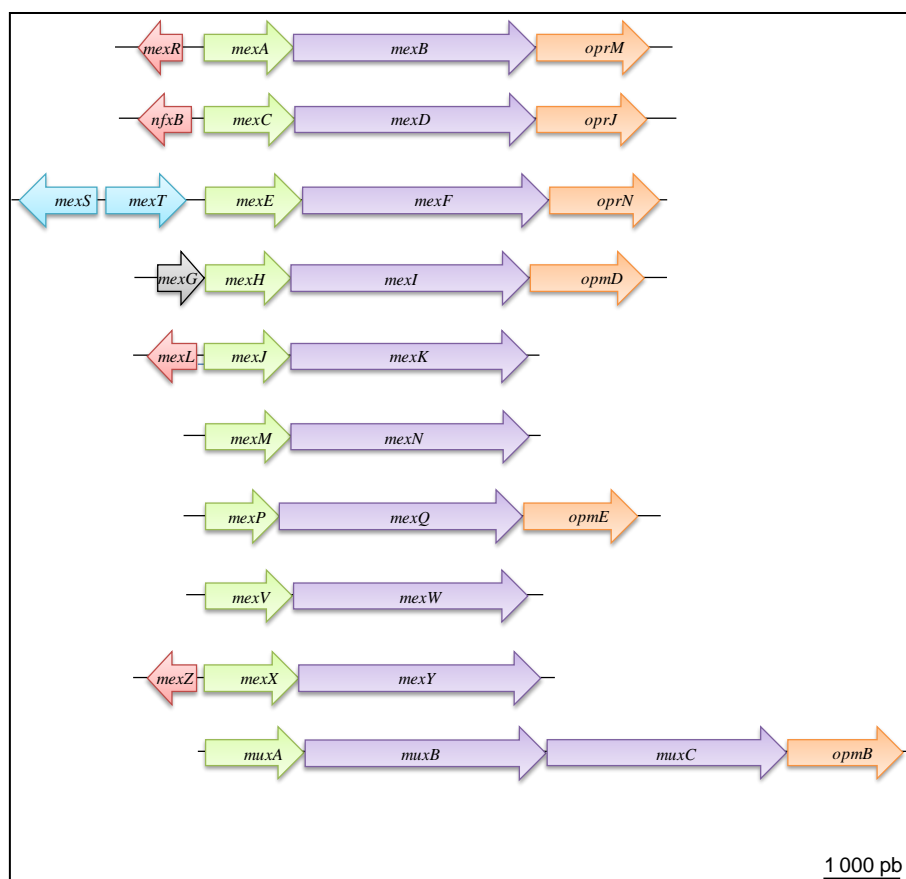


Figure 17. Représentation schématique des opérons codant les systèmes d'efflux RND de *P. aeruginosa* impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

Les gènes déterminant les différents constituants de la pompe d'efflux sont représentés en vert (la protéine adaptatrice), en violet (le transporteur RND) et en orange (la protéine de membrane externe). Les gènes situés en amont de ces opérons codent pour des régulateurs : répresseurs transcriptionnel (rouge) ou activateurs (bleu). Les gènes codant des protéines de fonction indéterminée sont représentés en noir.

2.6.2. *MexAB-OprM* : présentation et régulation

Ce système a été mis en évidence au cours d'une étude portant sur le transport du fer médié par les sidérophores (Poole *et al.*, 1993). La lipoprotéine périplasmique MexA, le transporteur MexB (famille RND) et la protéine de membrane externe OprM s'assemblent pour former une structure tripartite fonctionnelle. Polyspécifique, la pompe MexAB-OprM est capable outre les antibiotiques de transporter des solvants organiques (Li *et al.*, 1998a; Li and Poole, 1999), des détergents (SDS), des inhibiteurs de la synthèse des acides gras (thiolactomycine, céruléine) (Schweizer, 1998), une molécule-signal du *quorum sensing* (*N*-(3-oxo)-dodécanoyl-L-homosérine lactone : C12-HSL) (Evans *et al.*, 1998) (Pearson *et al.*, 1999), ainsi que des inhibiteurs de la déformylation des protéines (PDF-Is) (Caughlan *et al.*, 2009). De plus, elle pourrait être impliquée dans la virulence de *P. aeruginosa* puisque l'inactivation de l'opéron *mexAB-oprM* diminue la capacité de la bactérie à envahir une

monocouche de cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) et à entraîner la mort de souris infectées (Hirakata *et al.*, 2002).

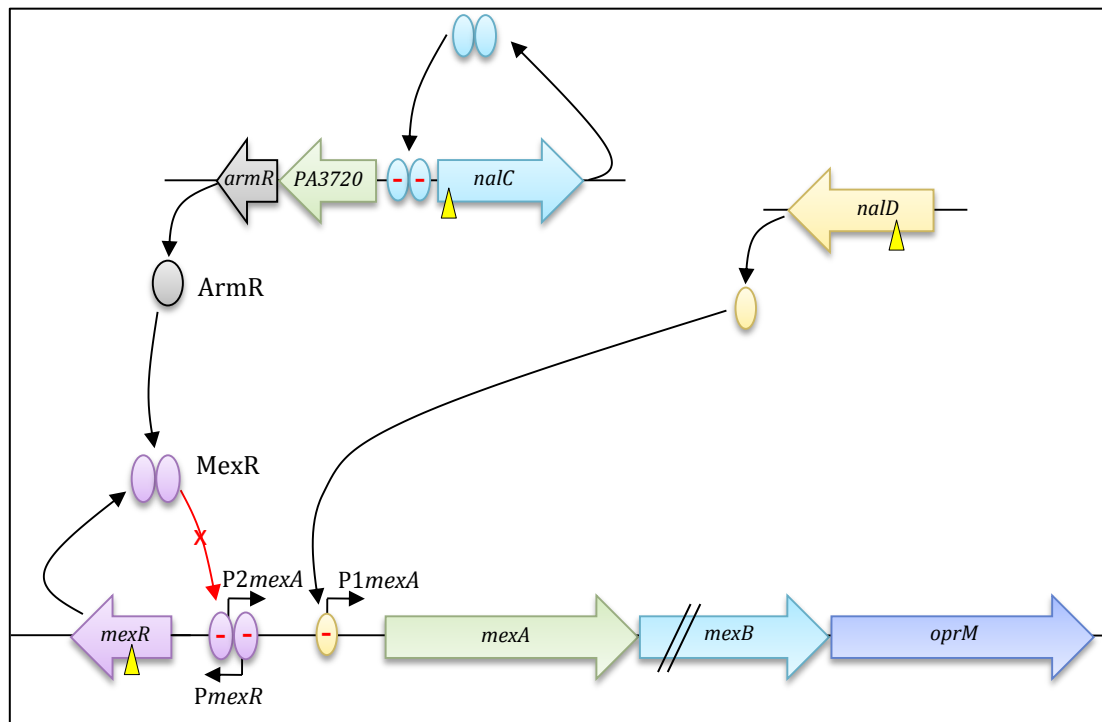


Figure 18. Représentation schématique de la régulation de l'expression de l'opéron *mexAB-oprM* chez *P. aeruginosa*.

Les triangles jaunes représentent les événements génétiques responsables de la surproduction du système MexAB-OprM.

L'expression de l'opéron *mexAB-oprM* est contrôlée négativement par le produit d'un gène régulateur adjacent, *mexR* (Poole *et al.*, 1996b) (Srikumar *et al.*, 2000) (Saito *et al.*, 1999). Ce répresseur qui appartient à la famille MarR se fixe sous forme d'homodimère sur deux sites composés de séquences inversées répétées situées au niveau de la région intergénique *mexR-mexA*. La zone de fixation comprend les promoteurs chevauchants de *mexR* et *mexAB-oprM*. Il en résulte que MexR réprime à la fois la transcription de l'opéron et sa propre expression (Evans *et al.*, 2001) (Saito *et al.*, 2001) (**Figure 18**). L'activité de MexR est elle-même modulée par une autre protéine dénommée ArmR (*Antirepressor for MexR*), dont le gène organisé en opéron avec un gène (*PA3720*) codant une protéine de fonction inconnue, est naturellement réprimé par un répresseur (NalC) de la famille TetR. Lorsqu'elle est produite, la protéine ArmR se fixe dans une cavité hydrophobe au sein du dimère MexR compromettant ainsi la liaison de ce dernier à l'ADN (Cao *et al.*, 2004) (**Figure 18**). Le troisième régulateur contrôlant la transcription de *mexAB-oprM* est également un répresseur. Il s'agit de la protéine NalD, codée par un gène localisé à distance de l'opéron (*PA3574*)

(Sobel *et al.*, 2005a). Ce membre de la famille TetR exerce son action en se fixant sur la région intergénique *mexR-mexA* au niveau d'un second promoteur de *mexAB-oprM*, différent de celui contrôlé par MexR (Morita *et al.*, 2006) (**Figure 18**).

Plus récemment, Sivaneson *et al.* ont identifié un nouveau mécanisme de régulation de l'opéron *mexAB-oprM* impliquant les systèmes Roc1 et Roc2 (Sivaneson *et al.*, 2011). Il a été démontré que la reconnaissance d'un signal par les senseurs RocS1 ou RocS2 était transmise au régulateur de réponse RocA1, qui une fois activé, régule positivement la transcription des gènes *cupC1*, *cupC2* et *cupC3*, dont les produits codent respectivement pour une sous-unité piline, pour une chaperonne périplasmique et pour la protéine « usher » majeur des *fimbriae* de type CupC (Kulasekara *et al.*, 2005). Néanmoins, le signal perçu par ces senseurs peut également être transmis au régulateur de réponse RocA2 et conduire à la répression de l'opéron *mexAB-oprM*. En effet, ce dernier est surexprimé chez un mutant privé du gène *rocA2* (Sivaneson *et al.*, 2011).

Par ailleurs, l'expression de *mexAB-oprM* est modulée par des conditions environnementales, comme par exemple la présence de chlorophénols dans le milieu de culture (Ghosh *et al.*, 2011) (Starr *et al.*, 2012). Il a été démontré que la protéine NalC était capable de se lier à ces molécules entraînant ainsi la surexpression du gène *armR* et de l'opéron *mexAB-oprM* suite à la séquestration de MexR par ArmR (Ghosh *et al.*, 2011). Ces résultats ont été remis en cause par l'équipe de K. Poole qui a montré que *mexAB-oprM* restait inductible en l'absence du gène *armR*, mais pas chez un mutant $\Delta mexR$ (Starr *et al.*, 2012). Il semble également que l'activité de la protéine MexR soit conditionnée par son état d'oxydo-réduction (Chen *et al.*, 2010). Par des expériences de retard sur gel, Chen *et al* ont mis en évidence que la fixation de MexR sur son ADN-cible diminuait lorsque la bactérie était incubée en présence d'un agent oxydant (CHP : *Cumene HydroPeroxide*) sauf si un pré-traitement par deux agents alkylants protégeait au préalable les groupements thiols de ses résidus cystéine C₃₀ et C₆₂, cibles potentielles de l'oxydation. L'oxydation de ces résidus conduit à la formation de ponts disulfure inter-monomères et entraîne la dissociation de MexR de l'ADN. Les conditions dans lesquelles le stress oxydant provoque la surexpression de *mexAB-oprM* restent toutefois à être précisées. Enfin, il semble que certains antibiotiques tels que les macrolides soient capables d'inhiber la surexpression de l'opéron *mexAB-oprM* sous la dépendance du quorum sensing (N-butyryl-L-homosérine lactone, C4-HSL) et de MexR (Maseda *et al.*, 2004) (Sugimura *et al.*, 2008).

2.6.2.1. Contribution à la résistance naturelle

L'opéron *mexAB-oprM* est exprimé constitutivement chez les bactéries sauvages (Figure 19).

La délétion d'un ou plusieurs de ses gènes a permis de confirmer le rôle de MexAB-OprM dans la résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux antibiotiques. En effet, l'inactivation des gènes *mexA* et/ou *mexB* chez la souche PAO1 ou un mutant (4098) dont la β -lactamase AmpC est produite à un niveau basal, conduit à une hypersensibilité aux β -lactamines, aux fluoroquinolones, à la tétracycline, au chloramphénicol, au triméthoprim et au sulfaméthoxazole (Kohler *et al.*, 1996) (Li *et al.*, 1995) (Li *et al.*, 1998b) (Masuda *et al.*, 1999) (Masuda *et al.*, 2000) (Morita *et al.*, 2001a) (Tableau 16).

Les différences de niveaux de résistance entre les mutants privés des gènes *mexA* ou *mexB* et ceux dont l'opéron *mexAB-oprM* éliminé s'expliquent par le fait que OprM est un élément constituant d'autres systèmes tels que MexXY/OprM (Aires *et al.*, 1999). D'ailleurs, il a été démontré que le gène *oprM* possédait son propre promoteur, distinct de ceux de l'opéron *mexAB-oprM*, permettant l'expression de *oprM* indépendamment de celle de *mexAB* (Zhao *et al.*, 1998). Cette caractéristique, commune à d'autres opérons tels que *smeABC* (*S. maltophilia*) (Li *et al.*, 2002) permettrait aux bactéries de produire une quantité suffisante de protéine de membrane externe pour le fonctionnement simultané de plusieurs pompes.

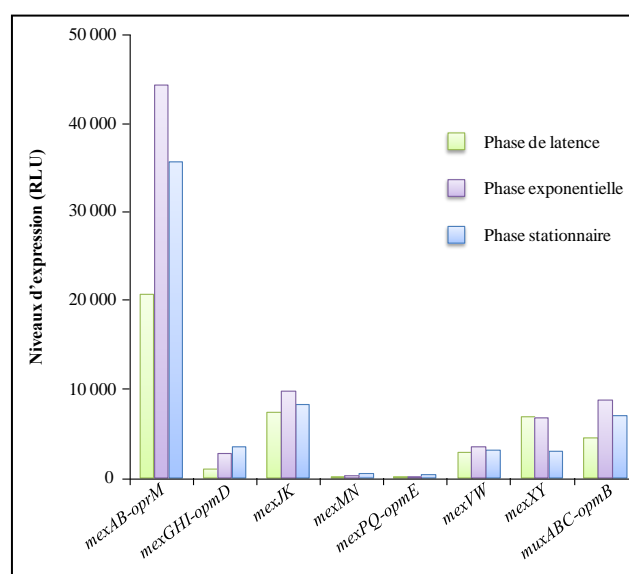


Figure 19. Niveaux d'expression relatifs, en milieu LB, des systèmes RND impliqués dans la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques selon la phase de croissance.

D'après (Chen *et al.*, 2011).

Tableau 16. Contribution des systèmes MexAB-OprM et MexXY/OprM à la résistance naturelle de *P. aeruginosa*.

Antibiotiques	PAO1			
	WT/ $\Delta mexAB-oprM^a$	WT/ $\Delta mexA$ et/ou $mexB^a$	WT/ $\Delta mexXY^a$	WT/ $\Delta mexXY \Delta mexAB-oprM^a$
AMP	2-4	nd	nd	nd
AMX	2	nd	nd	nd
ATM	32,8	8	(2)	8
CAR	32-64,64,32	32	1	32
CEF	4	nd	nd	nd
CFP	8,8	8	(2)	8
CLA	4	nd	nd	nd
CLO	2	nd	nd	nd
CMO	1	nd	nd	nd
CPD	1	nd	nd	nd
CPL	4	nd	nd	nd
CPO	4	2	1	4
CRO	2	nd	nd	nd
CTR	(2)	nd	nd	nd
DOR	(2)	nd	nd	nd
FMX	1	nd	nd	nd
IPM	1	nd	nd	nd
MEM	2	nd	nd	nd
MOX	2	nd	nd	nd
PAN	1	nd	nd	nd
PIP	16,8	nd	nd	nd
GEN	8,4	1,1	8,16	4-8,16
KAN	4	1	4	4
STR	16,8	1	8,16	8,16
ERY	8,16	1,4	4,4	8-16,8
CIP	8	1	1	8
LVX	8	2	1	8
NAL	16	4	1	16
NOR	4	2	2	4
OFX	8,16	2,4	2,1	16,8
SPX	8	2	2	8
TET	32,32	2,8	8,4	32-64,64
CHL	16	4	(2)	16

^a Les chiffres représentent la diminution ou (l'augmentation), en nombre de fois de la CMI, de la résistance consécutive à l'inactivation des différents gènes chez la souche sauvage PAO1. WT (*Wild Type*) : sauvage. nd : non déterminé. Adapté de (Li *et al.*, 1998b) (Masuda *et al.*, 1999) (Morita *et al.*, 2001a) (Masuda *et al.*, 2000).

2.6.2.2. Mutants spontanés et résistance acquise

L'ajout dans le milieu de culture de n'importe quel substrat de MexAB-OprM comme par exemple une β -lactamine (céfopérazone, cefsulodin, méropénème) ou une quinolone (acide oxolinique, acide pipémidique, acide nalidixique, fluméquine, énoxacine, ofloxacin, péfloxacin, ciprofloxacine, sparfloxacine, trovafloxacine) permet de sélectionner facilement *in vitro* des mutants surproduisant ce système (Kohler *et al.*, 1997b) (Saito *et al.*, 1999) (Srikumar *et al.*, 2000) (Tanimoto *et al.*, 2008) (Baum *et al.*, 2009). Selon leur structure, les 4 quinolones sélectionnent préférentiellement des mutants surexprimant des pompes différentes. Ainsi, l'acide nalidixique (à 2 et 3 fois la CMI) et la fluméquine (à 3 fois la CMI) ne sélectionnent que des bactéries surproduisant MexAB-OprM (Kohler *et al.*, 1997b).

Les mutants surproducteurs du système MexAB-OprM ont été divisés en trois types (*nalB*, *nalC*, *nalD*) en fonction du locus génétique altéré (**Figure 18**). Chez les mutants de type *nalB*, l'inactivation du gène *mexR* par divers événements (insertion, délétion ou substitution de nucléotides ; intégration de séquence d'insertion) entraîne la surexpression de l'opéron *mexAB-oprM* et l'accroissement de la résistance aux substrats du système (Kohler *et al.*, 1997b) (Saito *et al.*, 1999) (Srikumar *et al.*, 2000). Le gène *PA3721* (*nalC*), répresseur de l'opéron *PA3720-armR*, est inactivé chez les mutants de type *nalC*, ce qui a pour conséquence d'augmenter la synthèse de l'antirépresseur ArmR (Srikumar *et al.*, 2000) (Cao *et al.*, 2004). Enfin, chez les mutants de type *nalD*, c'est le gène répresseur de l'opéron *mexAB-oprM*, *PA3574* (*nalD*), qui est altéré. D'une façon générale, la surexpression de l'opéron multiplie la CMI des substrats du système de 2 à 16 fois, les mutants de type *nalB* étant en moyenne deux fois plus résistants que ceux de type *nalC* (Srikumar *et al.*, 2000) (**Tableau 17**).

Tableau 17. Contribution des systèmes d'efflux à la résistance acquise de *P. aeruginosa*.

Antibiotiques	MexAB-OprM ⁺⁺ /WT		MexXY ⁺⁺ /WT			MexCD-OprJ ⁺⁺ /WT		MexEF-OprN ⁺⁺ /WT
	<i>nalB</i> ^a	<i>nalC</i> ^a	<i>agrZ</i> ^a	<i>agrW1</i> ^a	<i>agrW2</i> ^a	<i>nfxB</i> type A ^a	<i>nfxB</i> type B ^a	<i>nfxC</i> ^a
ATM	nd	nd	nd	nd	nd	(2)	(4),(4)	nd
CAR	4-8,8	4,4	nd	nd	nd	(2-1)	(4)	(2),1-2
CAZ	2-4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(2-4)
CEF	nd	nd	nd	nd	nd	(2-1)	(2)	nd
CPO	4-8	nd	nd	nd	nd	8	8	1-2
FEP	4	2	2	4	2	nd	4	nd
IPM	nd	nd	1	1	8	(2)	(4),(4)	8,4
MEM	nd	nd	1	1	4	1	1	nd
TIC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(8)	nd
AMK	nd	nd	4	4,2,8	8	nd	(2)	nd
APR	nd	nd	2	2-4,4	4	nd	nd	nd
FOR	nd	nd	nd	4	nd	nd	nd	nd
GEN	nd	nd	4	2,4,8	4	1	(4-2),(2)	nd
KAN	nd	nd	nd	1,4	nd	(2)	(4)	nd
NEO	nd	nd	nd	2	nd	nd	nd	nd
NET	nd	nd	nd	4	nd	nd	nd	nd
PAR	nd	nd	nd	4-8	nd	nd	nd	nd
SPT	nd	nd	nd	2	nd	nd	nd	nd
STR	nd	nd	nd	4-8	nd	nd	nd	nd
TOB	nd	nd	2	2-4,2-4, 4	2	nd	(2)	nd
ERY	1-2	nd	nd	1	nd	nd	8	1,(2-1)
CIP	2-4	nd	4	4	4	nd	8	8,4-8
NAL	nd	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NOR	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8-16
NOV	nd	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
OFX	nd	nd	nd	nd	nd	8	32	nd
TET	4	2,2	nd	nd	nd	1-2	4	2,2
CHL	4-8,8	4,4	nd	nd	nd	1	4,2	16,≥16,>16
CST	nd	nd	1	1	2	nd	nd	nd
TMP	8-16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,4-8

^a Les chiffres représentent l'augmentation ou (la diminution), en nombre de fois la CMI, de la résistance consécutive à la surproduction du système (++) à partir de la souche PAO1. WT (*Wild Type*) : sauvage. nd : non déterminé. Adapté de (Kohler *et al.*, 1997b) (Srikumar *et al.*, 2000) (Cao *et al.*, 2004) (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999) (Lau *et al.*, 2012) (Muller *et al.*, 2011) (Masuda *et al.*, 1996) (Jeannot *et al.*, 2008) (Kohler *et al.*, 1997a) (Maseda *et al.*, 2000).

2.6.2.3. Contribution à la résistance des souches cliniques

L'émergence *in vivo* de mutants surproduisant le système MexAB-OprM a été souvent documentée. En effet, l'analyse de 21 paires de souches génétiquement identiques sensible (pré-traitement)-résistante (post-traitement) à au moins une β -lactamine, provenant de patients hospitalisés, a révélé chez 11/21 couples la présence de ce type de mutants (Ziha-Zarifi *et al.*, 1999). Dans 8/11 cas, l'existence de délétion ou d'insertion nucléotidique inactivant le gène *mexR* a été constaté. Deux souches présentaient des substitutions d'acides aminés dont l'impact n'a pas été étudié. Enfin, chez la dernière souche, aucune mutation n'a été identifiée dans *mexR*. Un travail complémentaire portant sur l'étude de 9 de ces couples isogéniques a montré que l'activité des fluoroquinolones (ciprofloxacine, grépafloracine, trovafloxacine, lévofloxacine, norfloxacine, moxifloxacine, ofloxacine et péfloxacine) diminuait de 2 à 8 fois (CMB) lorsque la pompe MexAB-OprM était surproduite (Dupont *et al.*, 2005). L'implication du système dans la résistance aux β -lactamines a été également étudiée chez 450 isolats collectés en 2004 dans 15 hôpitaux français. Parmi les 170 souches présentant une résistance à la ticarcilline ($\text{CMI} \geq 32 \mu\text{g/mL}$), 46% ont été caractérisés comme étant des mutants surproducteurs du système MexAB-OprM. La surexpression du système s'est révélée associée à d'autres mécanismes de résistance aux β -lactamines (dépression du gène codant la β -lactamase naturelle AmpC, production de pénicillinases, de carbapénémases ou de β -lactamases à spectre étendu) chez les souches les plus résistantes (Hocquet *et al.*, 2007).

Le rôle de MexAB-OprM dans la résistance aux carbapénèmes est plus discutable. En effet, une première étude portant sur 44 souches résistantes n'a retrouvé que 3 isolats surexprimant l'opéron *mexAB-oprM* (mutants de type *nalB*) (Pai *et al.*, 2001) alors qu'une autre portant sur 10 souches a mis en évidence un gène *mexA* surexprimé dans 100% des cas (Hammami *et al.*, 2009). L'analyse de 25 souches présentant divers niveaux de résistance au méropénème a, quant à elle, démontré que 0/12 souches sensibles à cet antibiotique, 3/5 intermédiaires et 7/8 résistantes, surexprimaient le gène *mexB* (Giske *et al.*, 2005). L'implication de MexAB-OprM dans la résistance aux fluoroquinolones a également été évaluée chez 85 isolats faiblement résistants à la ciprofloxacine ($\text{CMI} \geq 0,5 \mu\text{g/mL}$; ≤ 2) dont 31 (36,5%) se sont révélés être des mutants surproducteurs du système (Llanes *et al.*, 2011).

La prévalence des différents types de mutants a été déterminée, quant à elle, sur 12 isolats cliniques non reliés génotypiquement (Llanes *et al.*, 2004). Les auteurs ont démontré que 4 d'entre eux étaient des mutants de type *nalB*, 3 des mutants de type *nalC*, 4 des mutants

de type *nalD* et 1 à la fois *nalB/nalC*. D'autres mutants de type *nalD* ont été identifiés par Sobel *et al.* dans un contexte clinique (Sobel *et al.*, 2005a).

2.6.3. *MexXY/OprM* : présentation et régulation

Homologue du système AmrAB-OprA de *B. pseudomallei*, MexXY a été découvert conjointement par trois équipes différentes (Aires *et al.*, 1999) (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999) (Mine *et al.*, 1999). Son rôle dans la résistance naturelle aux antibiotiques a été mis en évidence grâce à un mutant obtenu par insertion de transposon pour lequel la CMI de l'amikacine était diminuée de 4 fois comparativement à la souche parentale, PAO1 (Aires *et al.*, 1999). Ce mutant était également hypersensible à l'érythromycine et à la tétracycline (CMI inférieures de 4 à 8 fois) mais de phénotype sauvage vis-à-vis d'autres antibiotiques tels que la ciprofloxacine, la norfloxacine, le chloramphénicol, le triméthoprim et l'acriflavine. L'identification du site de transposition a permis de caractériser le système MexXY/OprM (Aires *et al.*, 1999). Il est déterminé par un opéron de deux gènes dans lequel *mexX* code pour la protéine adaptatrice et *mexY* pour le transporteur, et par le gène *oprM* présent dans l'opéron *mexAB-oprM*.

Comme ce dernier, l'opéron *mexXY* est sous le contrôle d'un gène situé en amont, dénommé *mexZ*, codant un répresseur transcriptionnel de la famille TetR. Cette protéine est capable de se fixer sous forme d'homodimère sur les promoteurs chevauchants de *mexZ* et *mexXY* situés dans la région intergénique *mexZ-mexX*. MexZ réprime donc l'expression de *mexXY* ainsi que sa propre expression (Aires *et al.*, 1999) (Matsuo *et al.*, 2004).

L'activité de MexZ est, quant à elle, modulée par le produit d'un gène, *PA5471*, co-transcrit avec le gène, *PA5470*, codant un probable peptide « *releasing factor* » accessoire (Hay *et al.*, 2013) (Yamamoto *et al.*, 2009). L'expression de cet opéron est contrôlée par un mécanisme d'atténuation de la transcription lié à l'état de traduction d'une séquence nucléotidique située en amont de *PA5471-PA5470* et qui détermine un peptide leader de 13 acides aminés, nommé PA5471.1 (**Figure 20**). La transcription de PA5471.1 et de la région intergénique *PA5471.1-PA5471* (comprenant les régions 2, 3 et 4) conduit à la synthèse d'un ARNm capable d'adopter une structure secondaire définissant ou non un signal de fin de transcription. En règle générale, la traduction de l'ARNm codé par PA5471.1 permet à l'ARNm en aval de se replier pour former 2 motifs tige-boucle dont un comprenant les régions 3 et 4, précède une région riche en uracyles, ressemblant à un terminateur de

transcription. Dans ce cas, l'ARN polymérase se détache de sa matrice ARNm empêchant la transcription des gènes en aval dont *PA5471*. En revanche, la perturbation de la traduction de *PA5471.1* suite à une pause du ribosome sur cette région, simulée chez des mutants obtenus *in vitro* par des substitutions nucléotidiques générant l'apparition de codons stop, favorise un repliement de l'ARNm en une seule tige boucle (appariement entre les régions 2 et 3) ne définissant pas de motif de fin de transcription (Morita *et al.*, 2009). L'ARN polymérase poursuit alors son action et transcrit les gènes *PA5471-PA5470*. Lorsqu'elle est produite, la protéine *PA5471* (rebaptisée récemment *ArmZ* pour *Antirepressor for MexZ*) est capable d'interagir avec *MexZ* et ainsi d'empêcher sa fixation sur la région promotrice de *mexXY*.

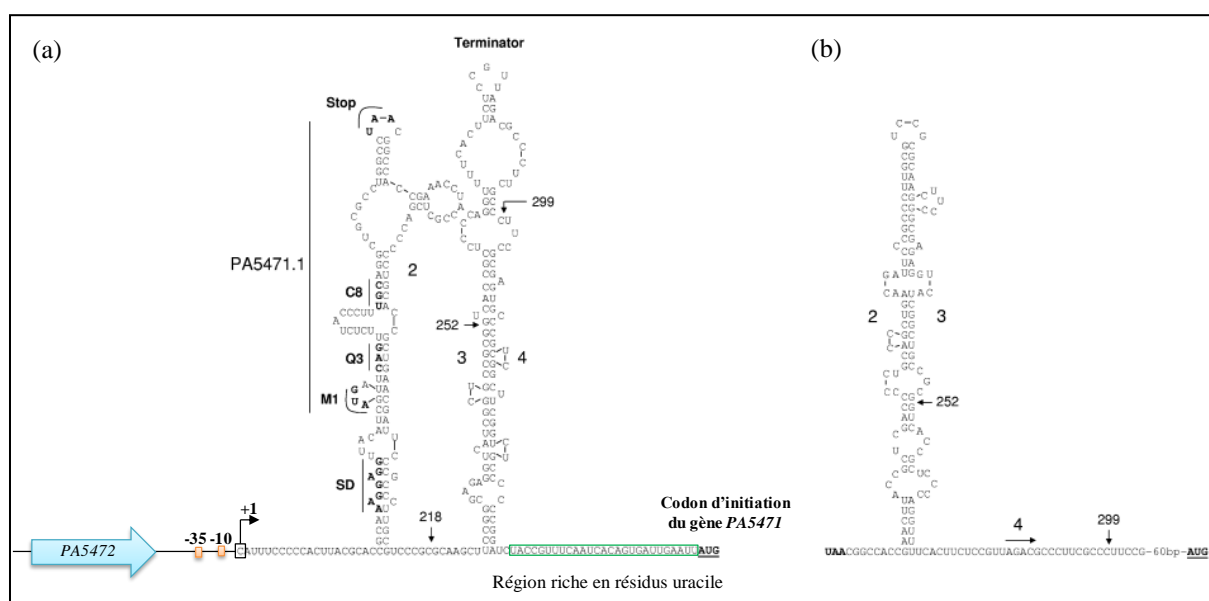


Figure 20. Structure de la région leader située en amont du locus *PA5471-PA5470*.

Les régions -10 et -35 sont indiquées en orange. La région riche en résidus uracile est encadrée en vert. Structure de la région leader en l'absence d'inducteur (a). Structure de la région leader en présence d'inducteurs de l'expression de l'opéron *PA5471-PA5470* (b). D'après (Morita *et al.*, 2009).

Lorsque la bactérie est exposée à des antibiotiques perturbant la synthèse protéique tels que les aminosides, les tétracyclines, les macrolides et le chloramphénicol (Jeannot *et al.*, 2005), la pause du ribosome au niveau de la région leader *PA5471.1* est supposée empêcher la formation du signal de fin de transcription et permettre à l'ARN polymérase d'engager la transcription des gènes en aval, dont *PA5471* (Morita *et al.*, 2009). La « neutralisation » de *MexZ* par la protéine *ArmZ* conduisant alors à la surexpression de *mexXY*.

L'expression de *mexXY* peut également être activée en présence de peptides cationiques tels que l'indolicidine, la colistine et la polymyxine B de manière indépendante de *ArmZ* (Muller *et al.*, 2011). Cette nouvelle voie de régulation implique un système à deux

composants dénommé ParRS (*Peptide adaptive resistance Regulator and Sensor*) impliqué dans la résistance naturelle de *P. aeruginosa* à la colistine. Bien que le signal perçu par le senseur (ParS) ne soit pas à l'heure actuelle identifié, il semble ne pas être associé à un phénomène de perméabilisation membranaire. En effet, il a été démontré que la polymyxine B nonapeptide (PMBN), molécule dérivant de la polymyxine B et possédant les mêmes propriétés perméabilisantes avec une activité antibactérienne plus faible, n'induisait pas la surexpression de *mexXY*. Néanmoins, une fois activé, le système ParRS via son régulateur de réponse ParR module l'expression de 19 gènes dont celle de *mexXY*, *oprD* et *arnBCDATEF-ugd*.

La délétion d'un second système à deux composants, PA2572-PA2573, impliqué dans la virulence de *P. aeruginosa* a conduit à la surexpression de l'opéron *mexXY*, de PA5471, ainsi que d'un certain nombre de gènes contrôlé par ParRS (McLaughlin *et al.*, 2012).

Il a également été rapporté que la surexpression d'un petit ARN, PaeIII, localisé entre les gènes PA3505 et PA3506 et produit en phase stationnaire, activerait l'opéron *mexXY* (Goldberg *et al.*, 2008).

2.6.3.1. Contribution à la résistance naturelle

MexXY/OprM contribue à la résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux aminosides, à la tétracycline et à l'érythromycine lorsque sa production est activée (Masuda *et al.*, 2000) (Vettoretti *et al.*, 2009) (**Tableau 16**). Exprimé à bas niveau dans des conditions de culture standards (**Figure 19**), l'opéron *mexXY* voit ainsi son expression fortement augmenter lorsque la bactérie est mise en présence d'antibiotiques capables d'inhiber la synthèse protéique (Jeannot *et al.*, 2005). La nécessité d'une induction explique pourquoi MexXY/OprM ne participe pas à la résistance naturelle aux fluoroquinolones et aux β -lactamines (céfépime et cefpirome). Comme le suggère une étude réalisée par Jo *et al.*, les protéines MexXY pourraient également interagir avec des protéines de membrane externe autres que OprM, telles que OpmG, OpmH et OpmI, pour assurer l'efflux des aminosides (Jo *et al.*, 2003). Néanmoins, la contribution de OpmG a été réfutée par Chuanchuen *et al.* en 2008 (Chuanchuen *et al.*, 2008).

2.6.3.2. Contribution à la résistance acquise

Les mutants surexprimant l'opéron *mexXY*, aisément sélectionnés *in vitro* sur des milieux refermant un aminoside (amikacine, tobramycine, gentamicine) ou une β -lactamine (céfépime) ou une fluoroquinolone (ofloxacin, norfloxacine, ciprofloxacine) peuvent être classés en trois catégories en fonction de leur atteinte génétique (Llanes *et al.*, 2004) (Muller *et al.*, 2011). Leur résistance aux substrats du système est augmentée d'un facteur 2 à 8 par comparaison avec les souches sauvages (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999) (Hocquet *et al.*, 2008) (Caughlan *et al.*, 2009) (Muller *et al.*, 2011) (**Tableau 17**). Les clones présentant des mutations dans le gène *mexZ* ou la région intergénique *mexZ-mexX*, capables d'altérer la fonction ou l'expression de la protéine MexZ ont été dénommés *agrZ* (*aminoglycoside resistance MexZ-dependent*) (Llanes *et al.*, 2004) (**Figure 21**). En revanche, les bactéries présentant un gène *mexZ* intact ont été baptisés *agrW*. Récemment, ce dernier groupe a été subdivisé en deux types appelés *agrW1* et *agrW2*.

Les mutants de type *agrW1* se caractérisent par des altérations de la synthèse protéique (**Figure 21**). Ainsi, la présence d'une mutation dans le gène *rplA* tronquant la protéine ribosomale L1 s'est révélée être à l'origine de la surexpression de l'opéron *mexXY* (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999). De la même manière, Lau *et al.* ont démontré que des mutations dans la région promotrice de l'opéron *rplU-rpmA* conduisaient à la sous-expression des protéines ribosomales L21 et L27 et indirectement la surexpression de *mexXY* (Lau *et al.*, 2012). D'après les auteurs, il semble que d'autres types de mutations pourraient également conduire à la sous-expression de L21 et L27.

La surexpression de *mexXY* a été également associée à des mutations localisées dans les gènes *fnt* ou *fold* codant respectivement la formyl méthionine transférase et une enzyme impliquée dans la synthèse du folate, les transcrits des gènes *mexX*, *mexY* et *mexZ* étant 2 fois plus abondants chez les mutants *fnt* que chez les mutants *fold* (**Figure 21**). Il est à noter que ces derniers ont été sélectionnés par un inhibiteur de la peptide déformylase (PDF-I) (Caughlan *et al.*, 2009). Tous ces mutants ont la particularité de surexprimer constitutivement le gène *PA5471*, nécessaire au phénomène d'induction par les antibiotiques. La cascade de régulation conduisant à la surexpression de l'opéron *mexXY* mime donc un état d'induction permanent du système. De plus, de nombreux mutants *agrW1* se caractérisent par des retards de croissance importants, en accord avec une altération de la synthèse protéique.

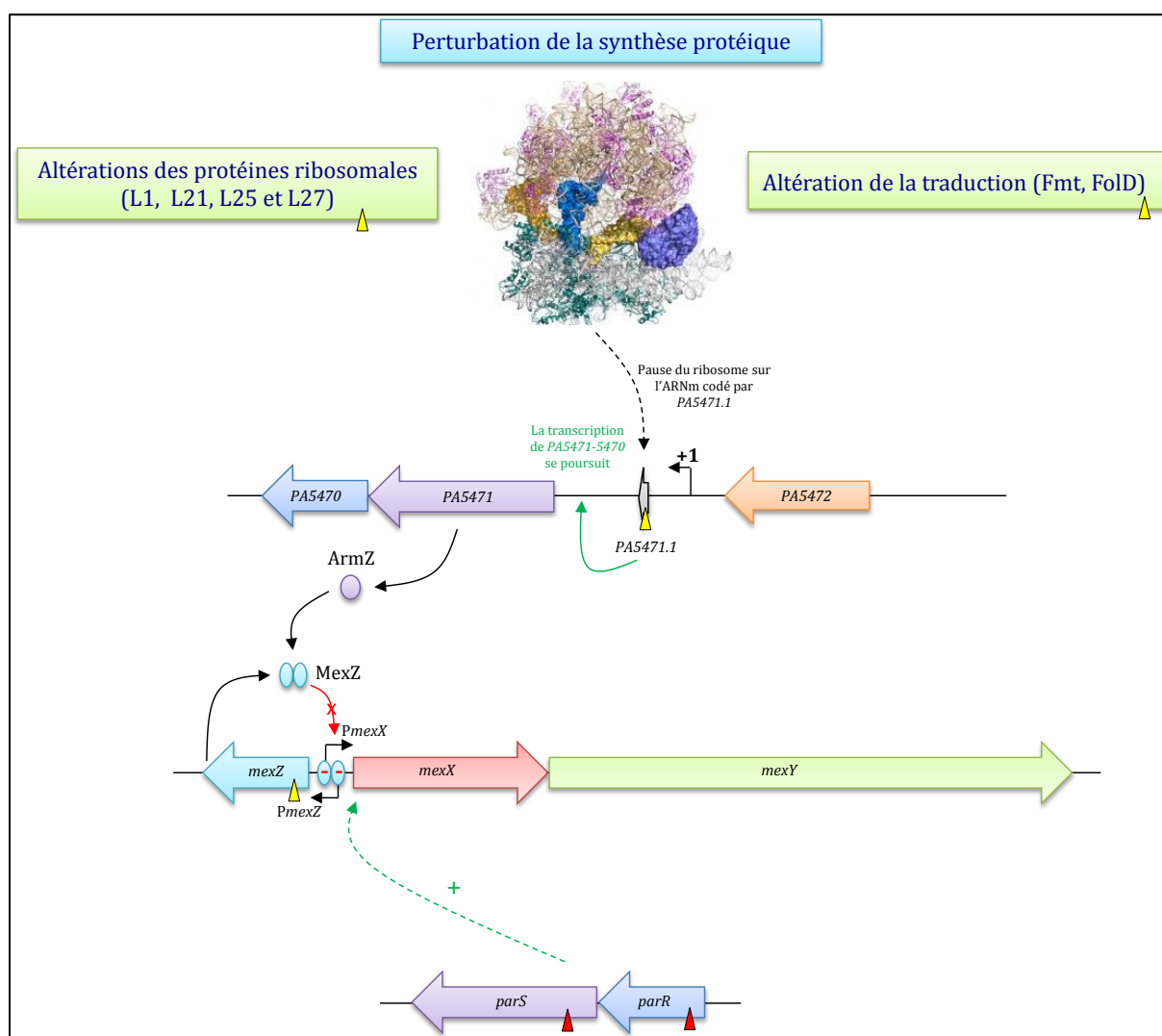


Figure 21. Représentation schématique de la régulation de l'opéron *mexXY* chez *P. aeruginosa*.

Les triangles jaunes représentent les mutations altérant la fonction de la protéine et celle en rouge conférant un gain de fonction.

Les mutants de type *agrW2* sont affectés dans le système à deux composants ParRS (Muller *et al.*, 2011) (**Figure 21**). Les substitutions M₅₉I et L₁₄Q situées respectivement, à proximité du site de phosphorylation (D57) dans la protéine ParR et dans le premier segment transmembranaire de l'histidine kinase ParS, engendrent une activation permanente du système à deux composants conduisant à la surexpression de l'opéron *mexXY* par un mécanisme à ce jour indéterminé. Le phénotype de résistance se distingue de celui des mutants *agrZ* et *agrW1* par une résistance plus élevée (2 à 8 fois) aux carbapénèmes et à la colistine (**Tableau 17**). Le phénomène est lié à la sous-expression du gène codant la porine OprD, porte d'entrée principale des carbapénèmes et à la surexpression de l'opéron *arnBCDATEF-ugd* (Fernandez *et al.*, 2012a). En ajoutant une molécule de 4-amino-4-déoxy-

L-arabinose sur les groupements phosphates (chargés négativement) du lipide A des LPS, les produits de cet opéron réduisent la charge négative des LPS, perturbant ainsi l'interaction des molécules cationiques. Ce mécanisme tend à s'opposer à l'entrée des antibiotiques chargés positivement tels que la colistine dans le cytoplasme.

La résistance acquise des souches de *P. aeruginosa* liée à MexXY ne peut être traitée sans citer le cas particulier de la souche PA7 (Roy *et al.*, 2010). Contrairement aux souches de référence PAO1 et PA14, la souche multi-résistante PA7 isolée en Argentine renferme un opéron de trois gènes *mexXY-oprA* dans lequel le troisième ORF code pour un homologue d'OprM (47% d'identité de séquence) dénommé OprA (57% avec OprA de *B. pseudomallei*). Chez cette souche, de génotype *agrZ*, les protéines MexXY s'associent avec OprA ou OprM. En effet, seule l'inactivation simultanée d'*oprM* et d'*oprA* modifie la sensibilité (de 8 à plus de 32 fois) à l'amikacine, la gentamicine, la tobramycine et la tétracycline (Morita *et al.*, 2012). Récemment, une étude a identifié dans un contexte clinique, une minorité de souches appartenant toutes au sérotype O:12, renfermant le gène *oprA* de PA7 (Morita *et al.*, 2012).

2.6.3.3. Contribution à la résistance des souches cliniques

Il est aujourd'hui bien établi que le système MexXY/OprM est un acteur majeur dans la résistance des souches cliniques aux aminosides. L'analyse, par l'équipe de K. Poole, de 14 souches pour la plupart pan-résistantes aux aminosides (résistantes à toutes les molécules de cette famille) a révélé chez celles-ci la présence de transcrits du gène *mexX* en quantité augmentée par rapport aux souches sauvages (Sobel *et al.*, 2003). Toutefois, aucune relation proportionnelle stricte entre les CMI des aminosides et les niveaux d'ARNm n'a pu être observée, suggérant la contribution de mécanismes additionnels. L'inactivation de l'opéron *mexXY* dans 9 souches a conduit à une diminution de la résistance aux aminosides de 2 à 64 fois selon les molécules et les souches. Ces résultats indiquent que MexXY/OprM peut être un déterminant majeur de la résistance aux antibiotiques notamment en présence de mécanismes additionnels (défaut de transport actif, production d'enzymes de modification des aminosides). De la même manière, dans une étude réalisée sur des souches provenant de patients atteints de mucoviscidose (CF) la surexpression de la pompe a été associée à une résistance modérée mais significative aux aminosides (2 à 16 fois) (Vogne *et al.*, 2004). Les travaux de Henrichfreise ont, quant à eux, illustré la forte prévalence (82%) des isolats surproduisant le système MexXY/OprM parmi des souches multi-résistantes ($n=22$) (Henrichfreise *et al.*, 2007). Le rôle du système MexXY/OprM dans la résistance au céfépime

a été démontré dans une population de souches plus résistantes au céfépime qu'à la ceftazidime (≥ 4 fois), seul le céfépime étant substrat de la pompe (Hocquet *et al.*, 2006). Quatre-vingt quatre % (32/38) des souches analysées surproduisait MexXY/OprM, seul ou en association avec d'autres mécanismes de résistance aux β -lactamines. Le transfert chez quelques souches d'un plasmide portant le gène *mexZ* sauvage a conduit à une diminution d'un facteur 2 à 8 de la CMI du céfépime, ce qui rend compte de la contribution du système à la résistance à cet antibiotique. Ces résultats ont été confirmés par Esquisabel *et al.* (Campo Esquisabel *et al.*, 2011). Comme le céfépime, le ceftobiprole est une céphalosporine zwitterionique prise en charge par MexXY/OprM. En effet, la caractérisation de couples de souches génotypiquement identiques isolées de patients traités par ceftobiprole, a mis en évidence une forte augmentation de la quantité des transcrits des gènes *mexX* et *mexY* chez les isolats résistants « post-traitement », qui présentaient tous des mutations dans le gène *mexZ* (Baum *et al.*, 2009). Le transfert du gène *mexZ* sauvage cloné sur un plasmide, a restauré la sensibilité de ces bactéries au ceftobiprole.

La caractérisation de 12 isolats cliniques non clonaux a révélé que 9 souches renfermaient des mutations inactivant le gène *mexZ* et/ou affectant la région intergénique *mexZ-mexX* (mutants nommés *agrZ*) et 2 souches des gènes *mexZ* sauvages (*agrW*) (Llanes *et al.*, 2004). Avant la réalisation de notre travail de thèse, seuls quelques rares mutants cliniques de type *agrW1* et *agrW2* avaient été identifiés. Ainsi, Lau *et al.* rapportent l'existence d'un isolat *agrW1* sous-exprimant les gènes *rplU-rpmA* (Lau *et al.*, 2012) et Muller *et al.* celle de 3 souches *agrW2* (dont une issue d'un patient atteint de mucoviscidose) affichant des substitutions d'acides aminés dans le senseur ParS ($n=2$) ou le régulateur de réponse ParR ($n=1$) (Muller *et al.*, 2011).

Finalement, les systèmes MexXY/OprM et MexAB-OprM peuvent être surproduits simultanément et conférer une résistance accrue à leurs substrats communs tels que le céfépime et la ciprofloxacine (Llanes *et al.*, 2004). Les effets additifs de ces deux pompes sur la résistance aux carbapénèmes sont plus discutables (Ikonomidis *et al.*, 2008).

2.6.4. *MexCD-OprJ : présentation et régulation*

L'opéron codant le système d'efflux MexCD-OprJ a été cloné pour la première fois par Poole *et al.* en 1996 (Poole *et al.*, 1996a). Son séquençage a révélé un fort degré d'identité au niveau protéique avec le système MexAB-OprM (43-46%) déjà connu à cette époque.

Contrairement à ce dernier, MexCD-OprJ ne participe pas à la résistance naturelle de la bactérie (Morita *et al.*, 2001b).

Comme MexAB-OprM, le système MexCD-OprJ est codé par un opéron composé de trois gènes où *mexC* code pour la protéine adaptatrice, *mexD* pour la pompe et *oprJ*, pour la protéine de membrane externe. Actuellement, un seul locus semble impliqué dans la régulation de l'expression de l'opéron *mexCD-oprJ*. Il s'agit du gène *nfxB*, localisé en amont et transcrit en sens inverse de l'opéron et qui code pour un répresseur de la famille LacI (Poole *et al.*, 1996a). En se fixant à un site composé de séquences répétées de 39 pb, situé au sein de la région intergénique *nfxB-mexC*, la protéine NfxB régule à la fois l'expression de *mexCD-oprJ* et sa propre expression (Shiba *et al.*, 1995). Faible chez les bactéries sauvages cultivées en conditions standards, l'expression de l'opéron est fortement induite par certains agents altérant les membranes cellulaires tels que le chlorure de benzalkonium et la chlorhexidine, les solvants, les détergents ou encore des antibiotiques comme la polymyxine B (Morita *et al.*, 2001b). Bien que le mécanisme ne soit pas totalement élucidé, l'induction fait intervenir le facteur sigma extracytoplasmique AlgU (Fraud *et al.*, 2008). Initialement identifié comme régulateur de la production d'alginate chez les souches de phénotype mucoïde, cet homologue du facteur sigma RpoE (*E. coli*) pourrait de manière directe ou indirecte modifier l'expression de *mexCD-oprJ*.

2.6.4.1. Implication dans la résistance acquise

Des mutants surproducteurs du système MexCD-OprJ ont été sélectionnés *in vitro* sur des milieux renfermant de l'érythromycine ou des 4-quinolones comme la trovafloxacin (Kohler *et al.*, 1997b) (Masuda *et al.*, 1996) (Jeannot *et al.*, 2008). L'acide nalidixique, l'acide oxolinique, la fluméquine et l'acide pipémidique n'ont pas permis l'émergence de ce type de mutants dans les conditions utilisées. La littérature rapporte l'existence de mutants 2 à 32 fois plus résistants aux antibiotiques substrats du système (cefpirome, érythromycine, fluoroquinolones, tétracycline, chloramphénicol, triméthoprim) pour lesquels le gène *nfxB* est altéré (Poole *et al.*, 1996a) (Jeannot *et al.*, 2008) (**Tableau 17**). Ceux-ci ont été divisés en deux catégories en fonction de leur sensibilité et du niveau de production de la pompe (Masuda *et al.*, 1996). Ainsi, les mutants de type B produisent plus de protéine OprJ et présentent une résistance plus importante que ceux de type A comparativement à la souche parentale (**Tableau 17**). Ces différences pourraient résulter de la nature des mutations affectant le répresseur NfxB entraînant, pour le type A, une simple diminution d'affinité du

répresseur NfxB pour le promoteur de l'opéron *mexCD-oprJ* et, pour le type B, une inactivation totale de la protéine (Masuda *et al.*, 1996). De plus, l'hypersensibilité des mutants à certaines β -lactamines pourrait être en relation avec une diminution de l'expression de l'opéron *mexAB-oprM* et/ou à une inductibilité moindre de la β -lactamase AmpC, alors que leur hypersensibilité aux aminosides serait due à un défaut d'activité du système MexXY/OprM (Gotoh *et al.*, 1998) (Masuda *et al.*, 2001) (Jeannot *et al.*, 2008).

2.6.4.2. Contribution à la résistance des souches cliniques

Les mutants surproducteurs du système MexCD-OprJ sont relativement rares dans le contexte clinique (Hocquet *et al.*, 2007) (El'Garch *et al.*, 2007). Leur présence semble associée à des conditions particulières. En effet, dans une collection de 110 isolats non-redondants modérément résistants à la ciprofloxacine (CMI de 0,5 μ g/mL à 4 μ g/mL), seuls 4 mutants *nfxB* ont été retrouvés (Jeannot *et al.*, 2008). L'analyse des dossiers des patients a révélé que ces souches avaient émergé durant une longue période de traitement par la ciprofloxacine. La rareté de ces mutants dans les infections humaines ne semble pas pouvoir s'expliquer par une virulence ou une cytotoxicité atténuée comme l'avait suggéré Linares *et al.* mais pourrait être associée à un défaut de fitness (Linares *et al.*, 2005) (Sanchez *et al.*, 2002b). Les mutants de ce type pourraient être plus fréquents chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, parmi 20 isolats modérément résistants à la ciprofloxacine (CMI 2 à 4 fois), 16 ont présenté des mutations dans le gène *nfxB* dont 8 associées à la surproduction de la protéine OprJ (Jalal *et al.*, 2000).

2.6.5. MexEF-OprN : présentation et régulation

Le système MexEF-OprN est codé par un opéron composé de trois gènes où *mexE* code pour la protéine adaptatrice, *mexF* pour la pompe et *oprN* pour la protéine de membrane externe. La régulation de l'expression de *mexEF-oprN* est assez complexe et se démarque de celle d'autres systèmes RND dans la mesure où elle n'est pas sous la dépendance d'un répresseur mais d'un activateur (Kohler *et al.*, 1997a) (Kohler *et al.*, 1999) (**Figure 22**). Effectivement, en amont de l'opéron *mexEF-oprN*, et dans la même orientation, se trouve un gène, *mexT*, codant un régulateur de la famille LysR capable de se lier à la région intergénique *mexT-mexE*.

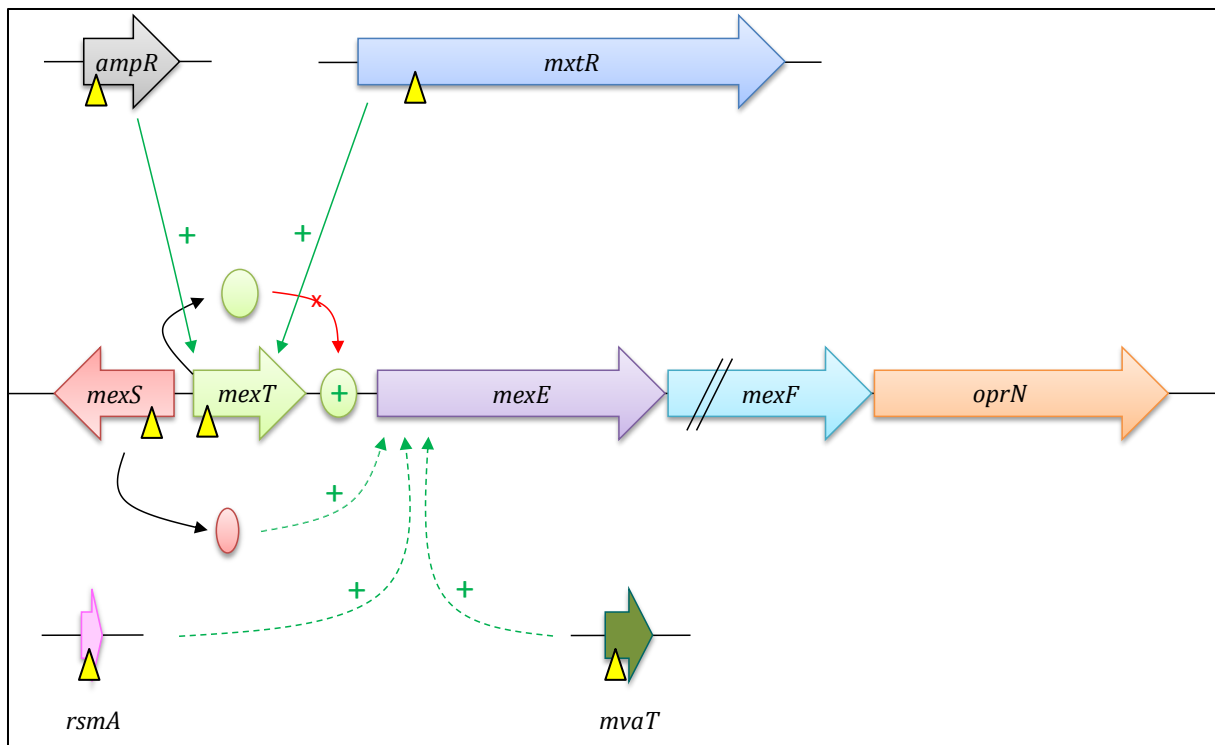


Figure 22. Représentation schématique de la régulation de l'expression de l'opéron *mexEF-oprN* chez *P. aeruginosa*.

Les triangles jaunes représentent les mutations altérant la fonction de la protéine. Les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression de l'opéron *mexEF-oprN* ne sont pas à l'heure actuelle totalement élucidés.

Chez les souches de phénotype sauvage telles que PAO1 et PA14, *mexEF-oprN* n'est pas exprimé car MexT est inactif (Llanes *et al.*, 2011). La surexpression de l'opéron est obtenue lorsqu'un gène, appelé *mexS*, situé en amont de *mexT*, est inactivé par des mutations. Ce gène, dont l'expression est régulée positivement par MexT code pour une probable oxydoréductase (Sobel *et al.*, 2005b). D'après certains auteurs, l'inactivation de la protéine MexS serait associée à l'accumulation de métabolites secondaires servant de molécules effectrices pour MexT qui en retour engendrerait la surexpression de *mexEF-oprN* dans le but d'exporter ces molécules toxiques hors de la cellule (Kohler *et al.*, 1999) (Llanes *et al.*, 2011). La protéine AmpR, régulateur du gène *bla_{ampC}* responsable de la synthèse de la β -lactamase AmpC et appartenant comme MexT à la famille LysR, semble impliquée dans la régulation de *mexEF-oprN* puisque son inactivation conduit à la surexpression de l'opéron et à celle de *mexT* (Balasubramanian *et al.*, 2012). De la même manière, l'inactivation du gène *mxtR* codant une protéine senseur kinase conduit à la surexpression de l'opéron (Zaoui *et al.*, 2012).

Par ailleurs, l'expression de l'opéron *mexEF-oprN* est contrôlée par une protéine de type « histone-like » appelée MvaT, un régulateur global impliqué notamment dans le contrôle des gènes contribuant à la formation du biofilm et à la virulence (Vallet *et al.*, 2004)

(Diggle *et al.*, 2002). Cette protéine est capable de se lier à des séquences d'ADN spécifiques riches en AT et de moduler l'expression de gènes cibles (Castang *et al.*, 2008). En effet, la délétion du gène *mvaT* aboutit à la surexpression de *mexEF-oprN*. Néanmoins, il a été démontré que MvaT ne se fixait pas en amont de *mexEF-oprN* (Westfall *et al.*, 2006). Le même scénario est observé lors de l'inactivation de *rsmA*, dont le produit est un régulateur post-transcriptionnel (Burrowes *et al.*, 2006).

Enfin, l'altération de loci encore non identifiés est à l'origine de l'émergence de mutants chez lesquels la surexpression de *mexEF-oprN* est indépendante de *mexT*, *mexS* et *mvaT* (Kumar and Schweizer, 2011).

2.6.5.1. Contribution à la résistance acquise

Le système MexEF-OprN, caractérisé par Khöler *et al.* en 1997, a été découvert suite à l'obtention de mutants résistants sélectionnés sur milieux supplémentés en chloramphénicol ou en ciprofloxacine (Kohler *et al.*, 1997a). Comme MexCD-OprJ, il ne participe pas à la résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (Morita *et al.*, 2001b). L'acide nalidixique, l'acide oxolinique, la fluméquine, l'acide pipémidique, la norfloxacine, l'énofloxacine, l'ofloxacine, la péfloxacine, et la sparfloxacine ont également permis la sélection de mutants surproducteurs du système contrairement à la trovafloxacine ou au CP-415,145 dans les conditions utilisées (Kohler *et al.*, 1997b). Bien que tous les mutants obtenus aient été regroupés sous le génotype, *nfxC*, la littérature mentionne l'altération d'au moins 2 loci différents. Le premier gène identifié est le gène *mexT*. Il a été démontré que chez certaines souches de phénotype sauvage, notamment de la lignée PAO1, ce gène était inactif en raison de la présence de 8 pb dans le cadre de lecture. Ainsi, chez ces souches, le phénotype *nfxC*, matérialisé par une augmentation de la résistance aux carbapénèmes, fluoroquinolones, chloramphénicol, triméthoprim et érythromycine, survient suite à la délétion de ces nucléotides additionnels (Maseda *et al.*, 2000) (**Tableau 17**). A noter que la résistance aux carbapénèmes observée résulte d'une baisse de production de la porine OprD et pas de la surproduction du système d'efflux (Kohler *et al.*, 1997a). Le second locus impliqué est le gène *mexS*, dont l'inactivation active la production de la pompe via MexT (Sobel *et al.*, 2005b).

2.6.5.2. Contribution à la résistance des souches cliniques

Les mutants surproducteurs du système MexEF-OprN ont rarement été identifiés dans le contexte clinique. Pumbwe *et al.* ont révélé l'existence d'un isolat surexprimant conjointement les systèmes MexAB-OprM et MexEF-OprN. Cependant, la mutation à l'origine du phénotype *nfxC* n'a pas été retrouvée dans le gène codant pour le seul régulateur transcriptionnel connu à l'époque, à savoir *mexT* (Pumbwe and Piddock, 2000). Plus récemment, une étude conduite par Llanes *et al.* a démontré que 2/10 souches *nfxC* présentaient des mutations dans *mexT*, 5/10 dans *mexS* et/ou *mvaT* (Llanes *et al.*, 2011). Chez 3/10 souches, aucun des gènes précités n'était altéré, ce qui suggère l'existence de gènes régulateurs encore inconnus. Selon ces auteurs, il se pourrait que la proportion de mutants de type *nfxC* soit sous-estimée en raison de mécanismes de résistance additionnels pouvant masquer le phénotype.

2.6.6. Autres systèmes

2.6.6.1. MexJK/OprM

La sélection *in vitro* de mutants résistants au triclosan à partir d'une souche privée des systèmes MexAB-OprM et MexCD-OprJ a conduit à la mise en évidence du système MexJK. Comme *mexXY*, la structure opéronique correspondant à cette pompe ne contient pas de gène codant la protéine de membrane externe. Néanmoins, les protéines MexJ et MexK peuvent s'associer avec OprM ou OpmH pour former une structure tripartite fonctionnelle (Chuanchuen *et al.*, 2005). L'association avec OprM est nécessaire pour le transport de l'érythromycine tandis que l'interaction avec OpmH permet le transport du triclosan. L'origine du phénotype observé chez ce mutant a été attribuée à la présence d'une mutation altérant le gène *mexL*, lequel est situé en amont de *mexJK* et code pour un répresseur du système de type TetR (Chuanchuen *et al.*, 2002).

Bien que le système soit exprimé chez les souches sauvages, son implication dans la résistance naturelle aux antibiotiques n'a pas été clairement démontrée (Chuanchuen *et al.*, 2002) (**Figure 19**). De plus, sa contribution à la résistance des souches cliniques apparaît très modeste puisqu'une seule étude rapporte l'existence de mutants surproducteurs du système en clinique (Hocquet *et al.*, 2006).

2.6.6.2. *MexHI-OpmD*

L'opéron *mexGHI-opmD*, dont la transcription est basale, ne semble pas jouer un rôle dans la résistance naturelle car son inactivation n'a pas d'effet sur celle-ci (Sekiya *et al.*, 2003) (**Figure 19**). En revanche, la culture d'une souche de *P. aeruginosa* privée des systèmes MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY sur un milieu supplémenté en norfloxacine a permis la sélection d'un mutant surproducteur du système (Sekiya *et al.*, 2003). D'après ces auteurs, seules les protéines MexHI et OpmD semblent impliquées dans la résistance acquise à la norfloxacine. Ce système avait initialement été considéré comme capable de transporter la tétracycline, ce qui n'a pas été confirmé par Sekiya *et al.* (Aendekerk *et al.*, 2002) (Sekiya *et al.*, 2003).

2.6.6.3. *MexVW/OprM*

L'obtention d'un mutant résistant sur milieu supplémenté en norfloxacine à partir d'une souche privée des gènes *mexAB*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN* et *mexXY* a permis de caractériser le système MexVW. Les protéines MexV et MexW, codées par l'opéron *mexVW* s'associent avec la protéine OprM pour effluer la norfloxacine, l'ofloxacine, le chloramphénicol, le cefpirome et la tétracycline (Abramson *et al.*, 2003). Cependant, la faible expression de l'opéron codant ce système semble indiquer qu'il n'intervient pas dans la résistance naturelle (Li *et al.*, 2003b) (**Figure 19**).

2.6.6.4. *MexPQ-OpmE et MexMN*

La caractérisation de ces deux systèmes a été réalisée au cours d'une même étude. En surexprimant les opérons *mexPQ-opmE* et *mexMN*, par l'intermédiaire d'un plasmide chez une souche de *P. aeruginosa* hypersensible aux antibiotiques, Mima *et al.* ont montré la capacité du système MexPQ-OpmE à exporter différentes molécules comme les macrolides et les fluoroquinolones et celle de MexMN à prendre en charge le chloramphénicol et le thiamphénicol grâce à son association avec OprM (Mima *et al.*, 2005). Cependant, leur implication dans la résistance naturelle et/ou acquise n'a pas été à ce jour élucidée.

2.6.6.5. *MuxABC-OpmB*

Un mutant surproducteur du système MuxABC-OpmB a été obtenu après exposition d'une souche ne possédant plus les gènes *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, *mexXY*, *mexHI-opmD*, *mexVW*, *pmpM* à la novobiocine. Cet isolat a conjointement présenté une résistance accrue à l'aztréonam, aux macrolides et à la tétracycline associée à la présence d'une mutation dans la région promotrice de l'opéron *muxABC-opmB* (Mima *et al.*, 2009).

L'opéron *muxABC-opmB* dont l'expression est basale ne semble toutefois pas jouer un rôle dans la résistance naturelle (Li *et al.*, 2003b).

2.6.6.6. *PmpM*

La surexpression du gène *pmpM*, codant un transporteur de la famille MATE, à partir d'un plasmide chez une souche de *P. aeruginosa* préalablement délétée de ses principaux systèmes d'efflux s'est traduite par une résistance accrue aux fluoroquinolones (He *et al.*, 2004).

2.6.6.7. *EmrE*

Un transporteur de la famille SMR, dénommé EmrE, a été identifié chez *P. aeruginosa*. Ce système qui est produit constitutivement participerait à la résistance naturelle aux aminosides (Li *et al.*, 2003a). Néanmoins, l'inactivation de son gène sensibilise la bactérie à ces antibiotiques uniquement dans un milieu nutritif de force ionique très faible, le milieu NB et pas dans des milieux riches tels que le MH ou le LB.

Au terme de cette revue bibliographique, il apparaît que le rôle joué par les mécanismes d'efflux dans la résistance des bacilles à Gram négatif non fermentaires aux antibiotiques reste mal connue et que seules les pompes de *P. aeruginosa* ont été explorées de façon systématique et approfondie.

Objectifs

Parmi les 10 systèmes d'efflux capables de prendre en charge les antibiotiques chez *P. aeruginosa*, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à MexAB-OprM et MexXY/OprM car ils sont les seuls à contribuer à la résistance naturelle de la bactérie et participent de manière significative à la résistance des souches cliniques. De plus, MexAB-OprM exporte une grande variété d'antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines et MexXY/OprM est l'unique système capable de prendre en charge les aminosides, deux familles de molécules largement utilisées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*. Ainsi, l'objectif de ce travail était de caractériser différents mutants d'efflux isolés dans un contexte clinique surproduisant MexXY/OprM ou déficient dans le système MexAB-OprM. Nous avons cherché à déterminer leur prévalence, à identifier les mutations à l'origine du phénotype observé et à mesurer les niveaux de résistance associés. Enfin, si l'on peut facilement comprendre l'intérêt pour la bactérie de surproduire son système d'efflux MexXY/OprM, il est plus difficile d'identifier les raisons la conduisant à perdre MexAB-OprM. Ainsi, nous avons tenté de déterminer quel(s) avantage(s) *P. aeruginosa* pouvait-elle tirer de l'inactivation de cette pompe majeure.

RÉSULTATS

A. Article 1

Rôle de MexAB-OprM dans la résistance naturelle de
P. aeruginosa à la témocilline

Publié dans « Journal of Antimicrobial Chemotherapy »

1. Présentation de l'étude

Développée et commercialisée en Belgique et au Royaume Uni dans les années 1980, la témocilline est une molécule ancienne dont l'utilisation a rapidement été abandonnée en raison de son manque d'efficacité envers les organismes anaérobies, les Gram positifs et *P. aeruginosa*. Néanmoins, ce dérivé 6- α -méthoxy de la ticarcilline (**Figure 23**) présente à l'heure actuelle un intérêt majeur sur les espèces du complexe « *Burkholderia cepacia* » et les entérobactéries productrices de BLSE (Béta-Lactamases à Spectre Etendu). En effet, cette molécule est particulièrement résistante à l'action de certaines β -lactamases de type CTX-M, et à celle des céphalosporinases de classe C (Livermore and Tulkens, 2009).

Si la forte résistance intrinsèque des souches de *P. aeruginosa* à la témocilline peut résulter de la faible perméabilité membranaire de la bactérie et/ou d'une liaison instable de l'antibiotique avec sa cible (PLP), elle pourrait également résulter d'un phénomène d'efflux actif. Ainsi, partant de l'observation que trois systèmes d'efflux sont reconnus comme étant capables d'exporter les β -lactamines (MexAB-OprM, MexXY/OprM, MexCD-OprJ), nous avons voulu savoir si la témocilline constituait un substrat pour l'un d'entre eux.

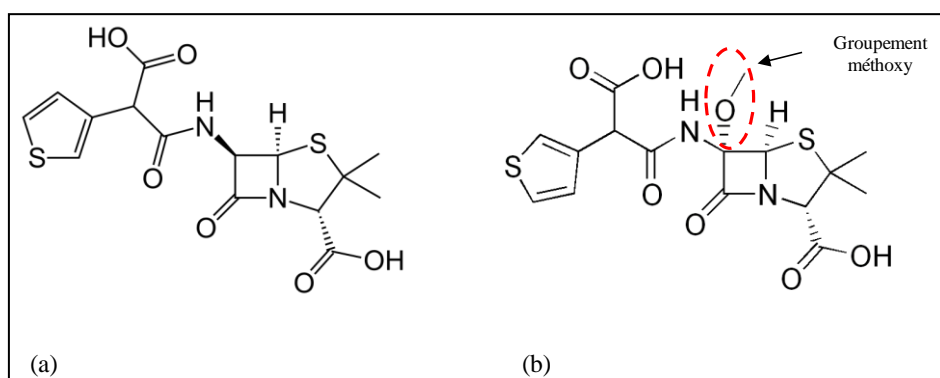


Figure 23. Structure de la ticarcilline (a) et de la témocilline (dérivé 6- α -méthoxy) (b).

2. Résultats

La mesure de la résistance de différents mutants obtenus *in vitro* a révélé que seule l'inactivation des gènes codant pour le système MexAB-OprM augmentait significativement la sensibilité des isolats à la témocilline (64 à 256 fois) comme cela est observé pour la ticarcilline (64 fois). Inversement, la surexpression du système s'accompagne d'une augmentation de la résistance d'un facteur 8 vis-à-vis de ces deux molécules. L'étude de souches cliniques exprimant différentes quantités de transcrits du gène *mexA* ($n=7$) et d'une

collection d'isolats CF déficients dans le système MexAB-OprM par altération des gènes *mexA* ou *mexB* ($n=12$) (*cf* partie « Autres travaux », page 151) a permis de corroborer ces résultats. Enfin, la comparaison des phénotypes de résistance d'une souche dont la β -lactamase AmpC est produite à un faible niveau non inductible et de son parent surproduisant cette enzyme n'a pas mis en évidence de différence significative, ce qui confirme la bonne stabilité de la témocilline vis-à-vis de la céphalosporinase naturelle du bacille pyocyanique.

3. Conclusion

Ces résultats démontrent clairement l'implication du système MexAB-OprM dans la résistance naturelle de *P. aeruginosa* à la témocilline et la résistance acquise des souches cliniques.

Ma participation à ce travail a consisté à créer le mutant PAO1 Δ *oprM* (SG01), à déterminer les CMI de la témocilline et de la ticarcilline chez diverses souches dont la bactérie de référence PAO1, les mutants construits *in vitro* (FB1, SG01, CMZ091, CM114 et PAO1 Δ *dacB* (mutant fourni par A. Oliver)) et les isolats cliniques CF déficients dans le système d'efflux MexAB-OprM.

4. Texte de l'article

transformants, the 40–70 kb plasmid was detected, occasionally together with a 250 kb plasmid, which might result from the fusion of plasmids of smaller sizes. Southern hybridization using *bla*_{CTX-M}, *IncF* and *IncR* sequences as probes demonstrated that the 40–70 kb plasmid was of the *IncR* type and carried the *bla*_{CTX-M-15} gene.

Amongst the 24 *K. pneumoniae* isolates, 17/24 were from pets that underwent cystostomy or perineal urethrostomy in the same referral hospital, two surgical procedures that aim at solving bladder or urethral occlusions due to abundant crystals in urine in healthy animals. Of the seven others, three (strains 24492, 24418 and 24419; Table 1) were from animals visiting two neighbouring regular veterinary clinics. Interestingly, two of them (24492 and 24418) were from animals hospitalized for similar urinary tract surgery in the above-mentioned referral hospital a few weeks before, and one of these two dogs died after a severe chronic infectious cystitis, a classical post-operative complication of urethrostomy. The third isolate (24419) was recovered 2 months later in the same regular clinic as isolate 24418, but from a diabetic dog that had no history with the referral hospital. No epidemiological data could be obtained for the four remaining *K. pneumoniae* isolates, which were recovered from different veterinary clinics located in the same geographical area.

This study reports recurrent veterinary hospital-acquired infections in pets with a ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* ST15 clone and this mirrors the situation observed for nosocomial infections in human hospitals. A spread of this clone outside the veterinary hospital through post-operative follow-up is also suggested. Of concern, this clone has been reported in humans and the hypothesis of a direct human origin, such as from a pet's owner, remains open. However, since the ST131/CTX-M-15 *E. coli* clone has also been reported in pets,⁵ a transfer to *K. pneumoniae* of the *bla*_{CTX-M-15} gene from *IncFII*-type plasmids found in *E. coli* is also plausible. Finally, this study is also the first report of a *bla*_{CTX-M-15} gene on an *IncR*-type plasmid in animals, a combination only recently reported in humans.^{3,8}

Acknowledgements

We are grateful to Alessandra Carattoli for providing the plasmid incompatibility group controls, and we thank Estelle Saras for her excellent assistance in this work. We also thank Claudine Tiberge for her skilled assistance, as well as the veterinary practitioners for their help in gathering all epidemiological data.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses).

Transparency declarations

None to declare.

References

1 Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist* 2011; **17**: 83–97.

2 Lee MY, Ko KS, Kang CI et al. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **38**: 160–3.

3 Coelho A, González-López JJ, Miró E et al. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **36**: 73–8.

4 Abbassi MS, Torres C, Achour W et al. Genetic characterisation of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from stem cell transplant patients in Tunisia. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **32**: 308–14.

5 Platell JL, Johnson JR, Cobbold RN et al. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet Microbiol* 2011; **153**: 99–108.

6 Ruiz E, Rojo-Bezares B, Saenz Y et al. Outbreak caused by a multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain of new sequence type ST341 carrying new genetic environments of *aac(6')-Ib-cr* and *qnrS1* genes in a neonatal intensive care unit in Spain. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**: 464–9.

7 Carattoli A, Bertini A, Villa L et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.

8 Ruiz E, Rezusta A, Saenz Y et al. New genetic environments of *aac(6')-Ib-cr* gene in a multiresistant *Klebsiella oxytoca* strain causing an outbreak in a pediatric intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **69**: 236–8.

J Antimicrob Chemother 2012

doi:10.1093/jac/dkr543

Advance Access publication 3 January 2012

Role of MexAB-OprM in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to temocillin and impact on the susceptibility of strains isolated from patients suffering from cystic fibrosis

Julien M. Buyck¹, Sophie Guénard², Patrick Plésiat², Paul M. Tulkens¹ and Françoise Van Bambeke^{1*}

¹Cellular and Molecular Pharmacology, Louvain Drug Research Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium;

²Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Jean Minjoz, Besançon, France

*Corresponding author. Tel: +32-2-7647378; Fax: +32-2-7647373; E-mail: francoise.vanbambeke@uclouvain.be

Keywords: ticarcillin, MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, Phe-Arg-β-naphthylamide

Sir,

Temocillin (6-α-methoxy-ticarcillin) is resistant to most β-lactamases, including AmpC and extended-spectrum β-lactamases, and is therefore considered a useful alternative to carbapenems in infections caused by several resistant Gram-negative pathogens.¹ Yet, temocillin is inactive against

Table 1. MICs of temocillin and ticarcillin for *P. aeruginosa* strains with known efflux characteristics, as measured in Mueller–Hinton broth (MHB) or in MHB supplemented with the broad-spectrum efflux inhibitor PAβN (50 mg/L)

Strain	Origin or ref.	Description	Efflux characteristics, gene expression level					MIC (mg/L)	
			<i>mexA</i> ^a	<i>mexX</i> ^a	<i>oprM</i> ^a	<i>mexC</i> ^b	<i>mexE</i> ^b	temocillin (+ PAβN ^c)	ticarcillin (+ PAβN ^c)
Reference strain									
PAO1	ATCC		1	1	1	—	—	256–512 (64)	32 (16)
Engineered strains									
FB1	d	PAO1 <i>mexB::FRT</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2	0.5
CB536	e	PAO1 <i>ΔmexCD-oprJ</i>	1.09	1.65	ND	—	+	128 (16)	8 (1)
CB603	e	PAO1 <i>ΔmexEF-oprN</i>	1.21	1.02	0.51	—	—	128 (32)	16 (16)
CB602	e	PAO1 <i>mexXY::FRT</i>	1.10	0.06	0.55	—	+	64 (16)	16 (16)
PAO1 <i>mexAB</i>	f	PAO1 <i>mexAB::FRT</i>	0 ^g	1.08	ND	—	+	4 (2)	2 (2)
PAO200	f	PAO1 <i>ΔmexAB-oprM</i>	0 ^g	1.26	ND	—	—	4 (0.5)	2 (0.5)
SG01	h	PAO1 <i>ΔoprM</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2	0.5
CMZ091	i	PAO1 <i>ΔmexZ</i> (MeXY overproducer)	ND	ND	ND	ND	ND	256	16
CM114	h	PAO1 <i>ΔmexXY</i>	ND	ND	ND	ND	ND	256	32
4098	j	PAO1 <i>met-9020 pro-9024 blaP-9208</i> (weak AmpC producer)	1.26	1.62	0.33	—	—	128	8
4098E	k	4098 overproducing MexAB-OprM	5.41	1.31	3.19	—	—	1024 (512)	64 (32)
4098ET	k	4098E <i>ΔoprM</i>	2.18	0.04	0.02	—	—	2 (1)	2 (1)
PA <i>ΔdacB</i>	m	PAO1 <i>ΔdacB::lox</i> (AmpC overproducer)	ND	ND	ND	ND	ND	128	64
Clinical isolates from patients with HAP									
168B	n		1.15	0.89	ND	—	—	256 (32)	16 (16)
156	n		0.33	0.95	ND	—	+	512 (64)	256 (32)
68	n		0.87	44.94	ND	—	—	512 (64)	32 (16)
34	n		6.86	1.26	ND	—	—	>1024 (512)	256 (128)
333A	n		2.17	2.29	ND	—	—	>1024 (1024)	128 (128)
11	n		3.56	5.68	ND	—	—	1024 (64)	32 (32)
12	n		3.97	9.04	ND	+	+	512 (128)	64 (64)

Clinical isolates from cystic fibrosis patients

			Efflux characteristics, alterations					
			<i>mexA</i>	MexA	<i>mexB</i>	MexB		
3020S	^d		—	—	—	—	128	16
3020R	^d	isogenic to 3020S with deletion in <i>mexA</i>	Δ 112 nt (370–482)	aberrant	—	—	2	1
3525			—	—	—	—	512	32
3807		isogenic to 3525 with mutation in <i>mexA</i>	G214A	G72S	—	—	32	4
2715	^d	mutation in <i>mexA</i>	A590G	Y197C	—	—	32	2
616		mutation in <i>mexA</i>	C752T	S251F	—	—	1	0.5
2729	^d	deletion in <i>mexA</i>	Δ 8 nt (576–583)	aberrant	—	—	2	1
2933	^d	deletion in <i>mexA</i>	Δ 1 nt (870)	aberrant	—	—	2	0.5
2998	^d	deletion in <i>mexA</i>	C205T	truncated	—	—	2	0.25
2721	^d	deletion in <i>mexA</i>	Δ 1 nt (860)	aberrant	—	—	1	0.25
2716	^d	mutation in <i>mexB</i>	—	—	A776T	Q259L	1	0.5
2804	^d	deletion in <i>mexB</i>	—	—	Δ 1 nt (2147)	aberrant	4	1
2858	^d	deletion in <i>mexB</i>	—	—	Δ 1 nt (494)	aberrant	1	0.5
3066		deletion in <i>mexB</i>	—	—	G2364A	truncated	1	0.5

ND, not determined.

^aReal-time quantitative PCR [threshold ratio compared with PAO1; values shown in bold are considered as denoting highly significant overexpression (≥ 2 and ≥ 5 for *mexA* and *mexX*, respectively, based on the recommendations of the manufacturer of the kit used for their detection; no threshold value set for *oprM*); values interpreted as denoting an absence (or quasi-absence) of detection are shown in italics].

^bRT-PCR [semi-quantitative detection (+/–)].

^cPABN (broad-spectrum efflux inhibitor) used at 50 mg/L.

^dVettoretti et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1987–97.

^eRobertson et al. *J Bacteriol* 2007; **189**: 6870–81.

^fMima et al. *J Bacteriol* 2007; **189**: 7600–9.

^gComplete absence of detection.

^hS. Guénard and P. Plésiat (unpublished results).

ⁱMuller et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1211–21.

^jLi et al. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 1732–41.

^kHamzehpour et al. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2392–6.

^lNo growth in the presence of PABN (PABN MIC=25 mg/L for this strain).

^mMoya et al. *PLoS Pathog* 2009; **5**: e1000353.

ⁿIsolated from ICUs in Belgium.

Pseudomonas aeruginosa, possibly because of poor permeation across the outer membrane barrier and/or reduced binding to penicillin-binding proteins.¹ However, the role of multidrug efflux systems has not been examined so far. Three multidrug efflux systems have been reported to export β -lactams in *P. aeruginosa*, namely (from least to most effective) MexXY-OprM, MexCD-OprJ and MexAB-OprM.² We wondered whether temocillin could be the substrate of one or several of these transporters.

Temocillin (Eumedica, Brussels, Belgium) and ticarcillin (disodium salt; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were tested against: (i) the wild-type reference strain PAO1; (ii) a panel of laboratory strains with specific disruption(s) of the gene(s) encoding the three transporters mentioned above and MexEF-OprN, another efflux pump accommodating fluoroquinolones, trimethoprim and chloramphenicol, but not β -lactams,³ and producing different levels of AmpC; (iii) clinical isolates from patients hospitalized in intensive care units (ICUs) with hospital-acquired pneumonia (HAP); and (iv) strains from cystic fibrosis patients that were found to be hypersusceptible to carbenicillin and ticarcillin (Tic^{H5} phenotype) due to mutations in *mexA* or *mexB*.³ MICs were determined by microdilution in Mueller-Hinton broth (pH 7.4, 24 h) without or with the broad-spectrum efflux inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide (PA β N; 50 mg/L; Sigma-Aldrich).⁴ The expression of *mexA* and *mexX* was measured by quantitative real-time PCR, and that of *mexC* and *mexE* was measured by semi-quantitative RT-PCR. *mexA*, *mexB* and *oprM* were sequenced in strains from cystic fibrosis patients.³

The MIC of temocillin for PAO1 was ≥ 256 mg/L, but fell to 64 mg/L when tested in the presence of PA β N, a broad-spectrum competitive inhibitor of efflux transporters (Table 1), suggesting a role of active efflux in the intrinsic high-level resistance of *P. aeruginosa* to temocillin. The magnitude of the inhibitory effect of PA β N, however, varies depending on the substrate.⁴ To better quantify the impact of efflux on temocillin MICs, and also to identify the transporter(s) responsible for its efflux, we used isogenic strains deficient in the main efflux systems. Disruption of MexCD-OprJ, MexEF-OprN or MexXY only slightly affected the temocillin MIC (2–3 log₂ reduction), consistent with the strongly repressed expression of these three systems in wild-type strains. In contrast, disruption of *mexB*, *mexAB*, *oprM* or *mexAB-oprM* decreased MICs to values as low as 2–4 mg/L, with a minimal additional effect of PA β N. Conversely, overexpression of *mexAB*, but not of *mexXY*, further increased the temocillin MIC compared with PAO1. This clearly indicates that MexAB-OprM-driven efflux strongly contributes to the intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to temocillin, while the other Mex systems only play a minor role. We also confirmed the stability of temocillin to AmpC.

To examine the clinical relevance of our observations, we measured temocillin MICs for isolates collected from ICU patients with HAP. All values were high, but those from isolates overexpressing *mexA* were higher than those for PAO1, corroborating the importance of this efflux system in temocillin resistance. In parallel, we found that isolates obtained from cystic fibrosis patients and showing hypersusceptibility to ticarcillin were also hypersusceptible to temocillin, with MICs ranging between 1 and 4 mg/L in most cases. Interestingly enough, however, the MICs for some isolates with single nucleotide mutations in *MexA* (G72S and Y197C) remained moderately elevated (32 mg/L), suggesting that these mutated proteins remained partly functional.

Noteworthy, when considering all isolates examined here, differences between temocillin and ticarcillin MICs were much greater in isolates producing a functional or partially functional MexAB-OprM pump than in deficient strains (with temocillin MICs being 3–5 log₂ dilutions higher than those of ticarcillin). This suggests that temocillin is a preferential substrate for the MexAB-OprM transporter compared with ticarcillin, pointing to a potential role of the 6- α -methoxy substituent in its recognition and efflux.

While intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to temocillin makes this antibiotic unusable in most conventional clinical set-ups, we see here that impairment of efflux lowers the MICs to values below the current clinical susceptibility breakpoint for Enterobacteriaceae (16 mg/L; UK and Belgium) or even the pharmacokinetic/pharmacodynamic breakpoint proposed for a 4 g daily dose (8 mg/L).⁵ This may further trigger current efforts in designing clinically useful inhibitors of the MexAB-OprM transporter, since such combined therapy could provide the clinician with a useful alternative to current antipseudomonal β -lactams, especially if considering temocillin's remarkable β -lactamase stability. The present data may also have potential immediate application for cystic fibrosis patients. These patients can be infected by *Burkholderia cepacia*, against which temocillin is active and, therefore, commonly used.¹ Because of the large prevalence of *P. aeruginosa* isolates with the hypersusceptible Tic^{H5} phenotype in this patient population,³ temocillin could contribute to their eradication as well. Testing for temocillin susceptibility of *P. aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients appears, therefore, potentially useful.

Acknowledgements

We thank the clinical microbiology laboratories from our collaborating hospitals for collecting clinical isolates from patients suffering from HAP (see list in Riou *et al.* *Int J Antimicrob Agents* 2010; **36**: 513–22) and Eumedica, Brussels, Belgium, for providing us with microbiological standards of temocillin. We are also grateful to Virginie Mohymont for excellent technical assistance.

Funding

This work was supported by the Belgian *Fonds pour la Recherche Scientifique Médicale* (FRSM; grants 3.4597.06 and 3.4583.08). F. V. B. is *Maître de Recherches* of the Belgian *Fonds de la Recherche Scientifique* (F.R.S.-FNRS). J. M. B. is supported by the BioWin programme of the Belgian *Région Wallonne* (DG06).

Transparency declarations

P. M. T. is an unpaid adviser of Eumedica (manufacturer of temocillin); he does not have any financial interests in this company. J. M. B., S. G., P. P. and F. V. B. have no conflicts of interest to declare.

References

- 1 Livermore DM, Tulkens PM. Temocillin revived. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 243–5.
- 2 Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P *et al.* Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the

future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 1055–65.

3 Vettoretti L, Plesiat P, Muller C et al. Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1987–97.

4 Lomovskaya O, Warren MS, Lee A et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 105–16.

5 De Jongh R, Hens R, Basma V et al. Continuous versus intermittent infusion of temocillin, a directed spectrum penicillin for intensive care patients with nosocomial pneumonia: stability, compatibility, population pharmacokinetic studies and breakpoint selection. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 382–8.

J Antimicrob Chemother 2012

doi:10.1093/jac/dkr514

Advance Access publication 6 December 2011

Report of a *Salmonella enterica* serovar Typhi isolate from India producing CMY-2 AmpC β -lactamase

Karthikeyan Kumarasamy* and Padma Krishnan

Department of Microbiology, Dr. ALM PG IBMS, University of Madras, Taramani, Chennai 600 113, India

*Corresponding author. Tel: +91-99947-51555; Fax: +91-44245-40709; E-mail: skk.microbes@gmail.com

Keywords: bloodstream infections, ceftriaxone resistance, *ISEcp1*, *IncA/C*-type plasmids

Sir,

The emergence of multidrug-resistant *Salmonella* infection is an ever-increasing problem and is a cause for serious global concern. Resistance to third-generation cephalosporins in *Salmonella* has been attributed to the production of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), but resistance mediated by AmpC and KPC or metallo- β -lactamases ('MBLs') has also been reported.¹ In particular, the AmpC β -lactamases reported in

non-typhoidal *Salmonella* (NTS) are derivatives of CMY, DHA-1 and ACC-1,¹ although ACC-1-producing *Salmonella* Typhi has been recently identified in India.²

A *Salmonella enterica* serovar Typhi (designated B729) isolate was isolated from the blood culture of a child admitted to a hospital in Salem, Tamil Nadu, in December 2009. Species identification and antibiotic susceptibility were performed using an automated system (VITEK-2, bioMérieux Inc.). The isolate was further confirmed by serotyping using specific antiserum. This isolate was resistant to all the β -lactams (except carbapenems), but susceptible to non- β -lactam antibiotics. MICs of various antibiotics were determined using the agar dilution method, and susceptibility data were interpreted using EUCAST breakpoints (version 1.3; January 2011), while tetracycline and nalidixic acid susceptibilities were interpreted as recommended by CLSI guidelines (January 2011), as EUCAST breakpoints are not defined. B729 showed elevated MICs of all the β -lactams except carbapenems (<0.25 mg/L), co-trimoxazole (<1 mg/L), chloramphenicol (4 mg/L), aminoglycosides (<0.5 mg/L), tetracycline (2 mg/L), nalidixic acid (2 mg/L) and ciprofloxacin (<0.015 mg/L).

The presence of AmpC was determined by phenotypic methods, namely an AmpC disc test and a modified three-dimensional test.² PCR assays for the genes encoding β -lactamases³ showed that B729 carried *bla*_{CMY-2}. In addition, PCR mapping experiments⁴ and sequencing analysis revealed that the *bla*_{CMY-2} was flanked by *ISEcp1* and a *blc* gene, similar to the NTS isolates previously reported in the USA, Taiwan and Europe.

Plasmid analysis using the Kieser technique revealed that B729 harboured three plasmids, with respective sizes of 90, 70 and 25 kb, using *Escherichia coli* NCTC 50192 as a reference marker. To determine whether the AmpC phenotype was transferable, transconjugation experiments were attempted using a ciprofloxacin-resistant clinical isolate of *Salmonella* Typhimurium and the azide-resistant *E. coli* J53 as the recipient. Transconjugants were selected on MacConkey agar plates containing cefotaxime (2 mg/L) and ciprofloxacin (1 mg/L) or sodium azide (200 mg/L). The AmpC phenotype was successfully transferred to both of the species tested. The plasmids of the transconjugants showing an AmpC phenotype were typed by PCR-based replicon typing.⁵ The plasmid profile revealed that the *E. coli* J53-p729A transconjugant carried a *bla*_{CMY-2}-positive 70 kb plasmid that belonged to the *IncA/C* incompatibility type (Table 1).

Table 1. Characteristics of *Salmonella* Typhi B729, transconjugants, *E. coli* J53 and *Salmonella* Typhimurium (clinical strain)

Strain	<i>bla</i> gene	Plasmid			MIC (mg/L)						
		rep typing	size (kb)	FT	AMP	AMC	CRO	CTX/CLA	CAZ	FOX	TZP
<i>Salmonella</i> Typhi B729	<i>bla</i> _{CMY-2}	—	90, 70, 24	—	>256	>128	>256	>128	>256	>128	128
<i>E. coli</i> -p729A	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>IncA/C</i>	70	2.3×10^{-2}	>256	>128	>256	>128	>256	>128	32
<i>Salmonella</i> Typhimurium-p729A	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>IncA/C</i>	70	5.4×10^{-4}	>256	>128	>256	>128	>256	>128	32
<i>E. coli</i> J53	—	—	—	—	<2	<2	<0.5	<0.5	<0.5	8	<4
<i>Salmonella</i> Typhimurium	—	—	—	—	<2	<2	<0.5	<0.5	<0.5	8	<4

AMP, ampicillin; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; CRO, ceftriaxone; CTX/CLA, cefotaxime/clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; FOX, cefoxitin; TZP, piperacillin/tazobactam; FT, frequency of transfer or transconjugation efficiency.

B. Article 2

Des mutations multiples sont responsables de la résistance aux aminosides par surproduction du système d'efflux MexXY/OprM chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*.

*Soumis à « Antimicrobial Agents and Chemotherapy » le 12 juin 2013,
accepté le 19 août 2013*

1. Présentation de l'étude

La caractérisation de mutants sélectionnés *in vitro* a permis d'associer la surexpression de l'opéron *mexXY* à la survenue d'altérations dans (i) le gène *mexZ*, dont le produit réprime naturellement l'opéron (mutants *agrZ*) (Vogne *et al.*, 2004), (ii) les gènes *parRS* codant pour un système à deux composants impliqué dans le contrôle de divers gènes tels que *PA1797* et le locus *arnBCADTEF-ugd* (mutants *agrW2*) (Muller *et al.*, 2011) et (iii) d'autres cibles dont l'inactivation perturbe la synthèse protéique et entraîne la surexpression du gène *PA5471* dont le produit, ArmZ, est un antirépresseur de MexZ (mutants *agrW1*) (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999) (Caughlan *et al.*, 2009) (Lau *et al.*, 2012). L'identification des événements génétiques à l'origine de l'apparition du phénotype MexXY/OprM (MexXY++) en clinique a montré une nette prédominance des mutants de type *agrZ*. Néanmoins, plusieurs études ont décrit l'existence de souches résistantes présentant un gène *mexZ* intact (Vogne *et al.*, 2004) (Campo Esquisabel *et al.*, 2011) (Sobel *et al.*, 2003) (Islam *et al.*, 2004) (Llanes *et al.*, 2004) chez lesquelles les mutations n'ont été que rarement caractérisées (Muller *et al.*, 2011) (Lau *et al.*, 2012) (Fournier *et al.*, 2013).

Ainsi, l'objectif de ce travail était, d'une part, d'évaluer la prévalence des 3 types de mutants dans une collection de souches cliniques surproductrices du système MexXY/OprM et, d'autre part, d'en identifier les déficits génétiques et leurs conséquences fonctionnelles.

2. Résultats

Dans cette étude, 92 souches cliniques de *P. aeruginosa* ont été sélectionnées sur la base de leur phénotype à l'antibiogramme, typique de mutants MexXY++, à savoir une résistance augmentée aux aminosides, à la ciprofloxacine et/ou au céfépime. Leur génotypage par puces à ADN (Clondiag) a permis de retenir 57 isolats non redondants chez qui la surexpression de l'opéron a été confirmée par la mesure des niveaux de transcrits du gène *mexY*. Le séquençage du gène répresseur *mexZ* a révélé que 57,9% (33/57) des souches possédaient des mutations conduisant à des décalages du cadre de lecture (29/33), à l'apparition de codons stop prématurés (3/33) ou à la délétion d'un codon (1/33) dans le gène. Parallèlement, 11/57 souches se sont révélées porteuses de mutations se traduisant par une (9/11 isolats) ou deux (2/11 isolats) substitutions d'acide aminé dans la protéine MexZ. Certaines substitutions ont été localisées au niveau de la zone de dimérisation (3/13) ou du domaine de liaison à l'ADN de MexZ (3/13). Les 7 mutations restantes ne concernaient pas de domaine structural

particulier mais affectaient des acides aminés qui, au sein des régulateurs de la famille TetR, sont très conservés. Quant aux 13/57 souches restantes, elles sont apparues produire une protéine MexZ identique à celle des souches de référence telles que PAO1 et PA14. La mesure des quantités de transcrits du gène *PA5471* nous a permis d'identifier 8/13 mutants de type *agrW1* (14%) dont 5 présentaient un retard de croissance à 37°C et à 44°C, en accord avec une synthèse protéique déficiente. Une délétion de 7 pb dans le gène *PA5471.1* qui détermine un peptide leader impliqué dans la régulation de l'expression de *PA5471* par atténuation transcriptionnelle a été trouvée chez une souche. Finalement, la quantification des transcrits des gènes *arnA* et *PA1797* ainsi que le séquençage des gènes codant le système à deux composant ParRS nous a conduit à mettre en évidence 5 nouveaux mutants de type *agrW2* (8,8%). Tous se sont avérés porteurs de mutations dans le gène codant le senseur histidine kinase, ParS du système, dont l'impact sur le phénotype a été confirmé par complémentation d'une souche PAO1 Δ *parRS*.

3. Conclusion

Ces résultats soulignent la multiplicité des événements génétiques conduisant à la surproduction du système MexXY/OprM chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*. En outre, notre travail démontre pour la première fois l'existence d'une proportion significative de mutants de type *agrW1* (14%) et de type *agrW2* (8,8%) en plus des isolats *agrZ* (77,2%) déjà décrits. Bien que les altérations génétiques à l'origine du type *agrW1* n'aient pas toutes été caractérisées, la totalité des souches de l'étude ont pu toutefois être classée dans l'une ou l'autre catégorie. Au final, il apparaît que *P. aeruginosa* est capable d'exploiter toutes les voies de régulation de l'opéron *mexXY* (MexZ, ArmZ, ParRS) pour accroître sa résistance aux antibiotiques par un mécanisme d'efflux actif.

4. Texte de l'article

**Multiple mutations lead to MexXY/OprM-dependent aminoglycoside resistance in
clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa***

Sophie Guénard,¹ Cédric Muller,¹ Laura Monlezun,², Philippe Benas,² Isabelle Broutin,²
Katy Jeannot,¹ and Patrick Plésiat^{1*}

Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Besançon, Université de Franche-Comté, France¹; Laboratoire de
Cristallographie et RMN biologiques, CNRS Université Paris Descartes, Paris, France².

***Corresponding author:**

Patrick Plésiat, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de
Besançon, 25030 Besançon cedex, France. Tel: (33) 3 81 66 82 86. Fax: (33) 3 81 66 89 14.
E-mail: patrick.plesiat@univ-fcomte.fr

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, aminoglycoside efflux, mutants

Running title: MexXY-upregulating mutants of *P. aeruginosa*

ABSTRACT

Constitutive overproduction of the pump MexXY/OprM (XY+/M) is recognized as a major cause of resistance to aminoglycosides, fluoroquinolones, and zwitterionic cephalosporins in *P. aeruginosa*. In this study, 57 clonally-unrelated strains recovered from non-cystic fibrosis patients were analyzed to characterize the mutations resulting in upregulation of the *mexXY* operon. Forty four (77.2%) of the strains, classified as *agrZ* mutants, were found to harbor mutations inactivating the local repressor gene (*mexZ*) of *mexXY* operon ($n=33$; 57.9%) or introducing amino acid substitutions in its product, MexZ ($n=11$; 19.3%). These sequence variations which mapped in the dimerization domain, the DNA binding domain, or the rest of the MexZ structure, mostly affected amino acid positions conserved in TetR-like regulators. The 13 remaining XY+/M strains (22.8%) contained intact *mexZ* genes encoding wild-type MexZ proteins. Eight (14.0%) of these isolates, classified as *agrW1* mutants, overexpressed gene PA5471 which codes for the MexZ antirepressor ArmZ, with 5 strains exhibiting growth defects at 37°C and 44°C consistent with mutations impairing ribosome activity. Interestingly, one *agrW1* mutant appeared to harbor a 7-bp deletion in the coding sequence of leader peptide PA5471.1 involved in ribosome-dependent, translational attenuation of PA5471 expression. Finally DNA sequencing and complementation experiments revealed that 5 (8.8%) strains, classified as *agrW2* mutants, harbored single amino acid variations in the sensor histidine kinase of ParRS, a two component system known to positively control *mexXY* expression. Collectively, these results demonstrate that clinical strains of *P. aeruginosa* exploit different regulatory circuitries to mutationally overproduce the MexXY/OprM pump and become multidrug resistant, which accounts for the high prevalence of XY+/M mutants in the clinical setting.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a frequent cause of nosocomial infections and is associated with a progressive lung deterioration in cystic fibrosis (CF) patients. In addition to its elevated intrinsic resistance to many anti-gram negative antibiotics, this pathogen is notoriously known for its ability to develop clinically relevant levels of resistance to the most potent antipseudomonal drugs available, including aminoglycosides (e.g., gentamicin, tobramycin, amikacin) . Beside the acquisition of plasmid- and/or integron- borne genes encoding various aminoglycoside-modifying enzymes, the major mechanism by which *P. aeruginosa* may readily decrease its susceptibility to these agents consists of production of RND (Resistance Nodulation cell Division family) efflux pump MexXY/OprM . This multispecific active efflux system accommodates a large range of antimicrobials including zwitterionic cephalosporins (cefepime, ceftazidime), macrolides (e.g., erythromycin), fluoroquinolones (e.g. ciprofloxacin), and tetracyclines (e.g., tetracycline, tigecycline) in addition to aminoglycosides (2-9). Ribosome protection experiments demonstrated that MexXY/OprM contributes to the natural resistance of *P. aeruginosa* only to those of the exported substrates able to induce *mexXY* operon expression, as a result of protein synthesis impairment . Of note, the outer membrane protein OprM which interacts with the periplasmic adaptor MexX and the RND transporter MexY to form a functional tripartite efflux machinery , is encoded by the constitutively expressed operon *mexAB-oprM* (11, 12). This drug-dependent activation of *mexXY* was found to depend upon the expression of a gene of unknown function, PA5471, itself transcriptionally coupled with a non essential gene (PA5470) encoding a putative accessory peptide releasing factor . When *P. aeruginosa* is exposed to subinhibitory concentrations of ribosome targeting drugs such as aminoglycosides, tetracyclines, macrolides and chloramphenicol (a poor if any substrate of pump MexXY/OprM), the PA5471-70 operon is overexpressed . This induction process has been proposed to rely on a sophisticated

transcription attenuation mechanism involving a short leader peptide, PA5471.1, whose coding sequence is located 5' upstream of the PA5471-70 transcript . In the absence of drug exposure, PA5471.1 was predicted to form a stem-loop structure with adjacent sequences on the leader mRNA ahead of PA5471-70, which coexists with a terminator-like second stem-loop thought to attenuate PA5471-70 transcription by RNA polymerase . Interference of antibiotics with the translation process, possibly up to a point where ribosomes stall, would prevent the formation of these secondary mRNA structures and thus allow PA5471 gene expression and subsequent *mexXY* activation . The PA5471 product, renamed recently ArmZ (for Anti-Repressor MexZ), was found to physically interact with and to negatively modulate the activity of MexZ, the local repressor of operon *mexXY* (15, 16). This TetR-like protein which binds as a dimer to the divergent overlapping promoters of *mexZ* and *mexXY* in the *mexZ-mexXY* intergenic region, would be relieved from its DNA binding site through its interaction with ArmZ, thus resulting in hyperexpression of *mexXY* . Although this two-step regulatory pathway is activated when *P. aeruginosa* is challenged with protein synthesis inhibitors some of which are good MexXY/OprM substrates, no evidence has been obtained indicating that these inducing agents directly interact with MexZ independently of ArmZ (i.e., with basal uninduced PA5471 gene expression) . The constitutive overproduction of proteins MexXY is generally associated with a 2- to 16-fold increase in the MIC of pump substrates (18, 19). In addition to CF and non CF clinical MexXY-OprM overproducing strains found to harbor mutations inactivating gene *mexZ* (e.g., indels, premature stop codons) or its product MexZ (e.g. amino acid substitutions), isolates harboring intact (wild-type) *mexZ* genes have repeatedly been reported (19-25) but rarely been characterized . The observation that MexXY/OprM upregulated mutants with defective protein synthesis can be selected *in vitro* on aminoglycoside (7, 26, 27) or peptide deformylase inhibitor suggested that such mutants might be hypovirulent and thus poorly relevant in the clinic because of impaired fitness. For

convenience, mutants of this latter type were called *agrW1* to differentiate them from *mexZ* mutants (dubbed *agrZ*). Recently, our group reported that single amino acid changes in the response regulator ParR or the sensor kinase ParS of two-component regulatory system ParRS may result in overexpression of both the *mexXY* operon and the LPS modification locus *arnBCADTEF-ugd*, along with decreased transcription of the porin OprD gene . Mutants (called *agrW2*) harboring alterations in ParRS could be identified in the clinical setting , some of which from severely ill patients admitted to intensive care units (ICU). The objective of the present study was to evaluate the prevalence of and to better characterize the three known types of MexXY-OprM overexpressing strains (i.e., *agrZ*, *agrW1* and *agrW2*) in a collection of genotypically-characterized clinical strains of *P. aeruginosa* resistant to aminoglycosides.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. In addition, 92 non consecutive clinical *P. aeruginosa* were selected from our laboratory collection. These strains, which were collected between 2001 and 2009 at the University Hospital of Besançon (France), were chosen for their typical MexXY/OprM-dependent resistance profile characterized by an at least twofold increase in the MIC of three or more of the following substrates compared with wild-type strain PAO1: tobramycin ($\geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$), amikacin ($\geq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$), apramycin ($\geq 32 \mu\text{g mL}^{-1}$), ciprofloxacin ($\geq 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), and/or cefepime ($\geq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Multidrug resistant bacteria exhibiting elevated resistance to amikacin ($\geq 128 \mu\text{g mL}^{-1}$), apramycin ($\geq 512 \mu\text{g mL}^{-1}$) and/or cefepime ($\geq 64 \mu\text{g mL}^{-1}$) were not retained because of probable expression of enzymatic mechanisms. All the bacterial cultures were grown in Mueller-Hinton broth (MHB) with adjusted concentrations of Ca^{2+} (from 20 to 25 mg/L) and Mg^{2+} (from 10 to 12.5 mg/L) (Becton

Dickinson and Company, Cockeysville, MD), or on Mueller-Hinton agar (MHA) (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Recombinant plasmids were introduced into *P. aeruginosa* strains by triparental matings and mobilization via the broad-host range vector pRK2013 harbored by *Escherichia coli* HB101 . Transconjugants were selected on Pseudomonas Isolation Agar (PIA, Becton Dickinson and Company) supplemented with 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ticarcillin, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tetracycline, or 2 000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin, as required. Transformants of *E. coli* were selected on MHA containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin, 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tetracycline, or 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin. Growth curves of selected *P. aeruginosa* strains were established in triplicates by monitoring the absorbance at 600nm of bacteria developing aerobically in 30 mL MHB at 37°C or 44°C under vigorous shaking (250 rpm).

Antibiotic susceptibility testing. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of selected antibiotics were determined by the standard serial twofold dilution method in MHA with inoculum of 10^4 CFU per spot, as recommended . Colistin MICs were determined by the macrodilution MHB procedure . Growth was assessed visually after 18 h of incubation at 35°-37°C.

Mapping of MexZ mutations. The three-dimensional structure of MexZ is available in the protein data bank (PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, code 2WUI). Its structure has been solved in the H32 space group with one monomer per unit cell. We generated the functional dimer by application of a crystallographic symmetry to analyze the consequences of the different mutations at the interface. In addition, to be able to analyze the DNA binding surface, a model was built of MexZ in complex with DNA. For that purpose, a search for DNA bound TetR-family regulators was performed in the PDB database, resulting in 4 different structures. The one presenting the smallest rmsd (root mean square deviation) with

MexZ monomer was further used as a template. It was the TetR/DNA structure complex (PDB code 1QPI) . The MexZ/DNA model was built by direct superposition of the two MexZ monomers on the two TetR ones using coot program . With 29% of sequence homology between the two proteins, the superposition leads to an rmsd of 12Å calculated on the 2x135 common Cα atoms. Mutations found in clinical strains were visualized on both the free and DNA-bound models of MexZ using MacPyMol software (DeLano Scientific LLC).

Alignment of protein MexZ with various TetR-like homologs. Multiple sequence alignment of the MexZ protein from *P. aeruginosa* was performed with homologs from different species using the Clustalw2 software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) in order to identify conserved regions. The different sequences were retrieved from the UniProt database (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) and Jalview software was used to edit alignment .

Chromosomal complementation with full length *parRS*. The *parRS* loci of strains exhibiting mutations in gene *parS* were amplified by PCR from genomic DNA using the primers CloparRSC1/CloparRSC2 or CloparRSBamHIS1/CloparRSHindIIIS2 (Table 2). The resulting DNA fragments were cloned either in pCR2.1 and next ligated to the EcoRV/SpeI restriction sites of plasmid mini-CTX1, or were cloned directly in BamHI/HindIII restricted mini-CTX1 . The recombinant plasmids were then transferred from *E. coli* CC118 to *P. aeruginosa* strain CM096 (PAO1Δ*parRS*) by conjugation with subsequent selection on tetracycline-PIA plates, to allow their chromosomal insertion into the *attB* site.

Gene transcripts quantification by RT-qPCR. Specific gene expressions were measured by real-time, quantitative PCR (RT-qPCR) after reverse transcription, as described previously . Briefly, 2 µg of total RNA were reverse transcribed with ImpromII reverse transcriptase as specified by Promega (Madison, WI). The amounts of specific cDNA were assessed in a

Rotor Gene RG6000 real-time PCR instrument (Qiagen, Courtaboeuf, France) by using the fast SybrGreen kit (Qiagen), primers designed from the sequence of *Pseudomonas* database v2.pseudomonas.com (Table 2), and *rpsL* transcripts as internal control. The mRNA levels of target genes were normalized in each strain with those of *rpsL* and expressed as a ratio (fold change) to that of wild-type strain PAO1 used as reference. Mean gene expression values were calculated from two independent bacterial cultures each assayed in duplicate. As established previously, transcript levels of *mexY* \geq 4-fold that of strain PAO1 were considered as significantly increased in clinical strains . Well-characterized MexXY-overproducing mutants derived from PAO1 (CMZ091, PAOW1, PAOW2) were used as positive controls to assess the overexpression of genes *mexY*, PA1797, PA5471, and *arnA* .

Genotype Analysis. The clonal relatedness of isolates was investigated by using Clondiag chips (Alere, Sèvres, France), which allow the identification of 14 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the core genome of *P. aeruginosa*. A genetic fingerprint (referred to as hexadecimal code) was assigned to each strain, corresponding to the SNP combination found (38).

RESULTS-DISCUSSION

Selection of clinical strains overproducing MexXY. In order to characterize the different types of MexXY-upregulated mutants occurring in the clinical setting, we screened a collection of 92 *P. aeruginosa* exhibiting a reduced susceptibility to typical MexXY/OprM substrates including aminoglycosides (tobramycin, amikacin, apramycin), ciprofloxacin, and/or cefepime. Subsequent RT-qPCR experiments confirmed that all the selected bacteria overexpressed gene *mexY* significantly compared to wild-type reference strain PAO1. As demonstrated by single nucleotide polymorphism (SNP) analysis with Clondiag chips (Alere®), 42 strains were unique, while 9, 1, 2, 1, 1, and 1 others were represented by 2, 3, 4, 5, 6, 10 isolates, respectively. Incidentally, these genotyping experiments pointed to the spread and persistence for years of several MexXY/OpM-overproducing clones in the hospital (data not shown). Finally, 57 genotypically distinct strains were retained for further investigations. As reflected by the MIC50 values of Table 3, their median resistance levels to MexXY/OprM substrates were close to that of typical *in vitro* selected *agrZ* (CMZ091), *agrW1* (PAOW1), and *agrW2* (PAOW2) mutants. Most of these bacteria were susceptible to tobramycin (91%) and amikacin (84%) according to the current CLSI breakpoints, and more resistant to cefepime than to ceftazidime as reported previously . Apramycin which is recalcitrant to many aminoglycoside modifying enzymes showed MIC values $\geq 32 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 55 strains of the selection (96.5% positivity).

MexZ deficient mutants. Sequence analysis of *mexZ* that encodes the local repressor of operon *mexXY* revealed that 33/57 (57.9%) strains carried a mutated, inactive gene due to frameshifts (29/33), premature stop codons (3/33), or codon deletions (1/33). In addition to these *agrZ* mutants, 11/57 (19.3%) strains appeared to harbor point mutations resulting in one (9 isolates) or two (2 isolates) amino acid substitutions in repressor MexZ, while 13/57

220 (22.8%) contained *mexZ* genes encoding wild-type PAO1 or PA14 proteins (by definition,
221 *agrW* mutants).

222 To better understand how the 13 mutations found in MexZ impact its activity, we mapped
223 these variations in our models of free- and DNA-bound MexZ structures (Fig. 1). The mutated
224 residues could be classified into three different groups with respect to their location in the
225 folded protein. Because they affect the dimer interface, the first group mutations (Gly172Asp,
226 Gly195Glu, and Ser198Ile) are predicted to strongly impair the dimerization of MexZ and its
227 subsequent binding to the regulatory sequences upstream of *mexXY*. Of note, Gly195Glu was
228 also identified in an extremely-drug resistant (XDR) international epidemic clone belonging
229 to the same sequence type, ST175 , as strain 2508 and 4 clonally-related isolates originally
230 selected for this study (data not shown). Sequencing of *mexZ* genes from ST175 strains
231 collected in various countries would confirm whether or not Gly195Glu is a signature for this
232 successful clonal complex.

233 Mutations of the second group, which mapped in the N-terminal helix-turn-helix domain of
234 MexZ (Thr32Asn, Gly46Ser and Gly50Asp) are also expected to abrogate DNA binding. It
235 should be noted that Thr32Asn was associated with group 1 mutation Ser198Ile in strain
236 4465. Finally, mutations of the third group were distributed all along the rest of the structure.
237 All of them except Leu128Met are assumed to disturb the 3-D structure of MexZ because of
238 their location in the core of the structure (Cys59Tyr, Phe192Tyr) or at helices interface
239 (Ile16Thr, Ala38Val, Val48Ala, Ala144Val). Phe192Tyr was associated with group 1
240 mutation Gly172Asp in strain 3245. Val48Ala was previously reported in MexXY-
241 overexpressing multidrug resistant *P. aeruginosa* from Germany . In addition to pure
242 structural effects, some additional points have to be noticed. Phe192 takes part in the
243 antibiotic binding pocket present in most members of the TetR family, even if it has been
244 suggested that MexZ does not interact with antibiotics although the cavity is present . Cys59

is at the bottom of the external helix ($\alpha 4$) supposed to transmit the protein conformational changes to its DNA binding domain . Its mutation into Tyr could rigidify the helix locally and abrogate this transmission. Ala38 is very close to the DNA fragment in the complex model. Consequently, it could also be considered as a DNA-binding actor as structure modifications not taken in account in our model can occur when MexZ binds to DNA. Finally, the consequence of the last mutation, Leu128Met in strain 3135, is more difficult to explain as it is located at the outer surface of the molecule. Nevertheless, in the structure of SimR (42), a TetR-family transcriptional regulator from *Streptomyces antibioticus*, a two helices insertion before the C-terminal helix and a N-terminal extension, that covers the region containing the equivalent residue to Leu128 is supposed to play a regulatory role. So, it can be hypothesized that the Leu128Met change disturbs the regulatory function of MexZ, maybe via its interaction with another partner.

AgrW1 type mutants. As reported above, 13 MexXY/OprM overproducers exhibited a wild-type, intact repressor MexZ compared with PAO1 and PA14. RT-qPCR experiments were performed to characterize these strains further (Table 4). Strongly supporting the notion that 8 strains can be classified as *agrW1* type mutants, expression of gene PA5471 which codes for the anti-repressor ArmZ turned out to be 3.5- to 15.6-fold higher in these bacteria than in PAO1 (these levels were increased 6.1-fold in the *in vitro* selected mutant PAOW1, Table 4). We thus looked for mutations in the loci already known to affect ribosomal functioning and to trigger constitutive, drug-independent activation of operon *mexXY* through the PA5471 product. However, analysis of the coding sequences of genes *rplA* , *rplY* , *fnt* and *fold* , as well as of the promoter region of the *rplU-rpmA* operon failed to reveal significant alterations (i.e., non-synonymous mutations, nucleotide insertions or deletions, premature stop codons) compared with strains PAO1 and PA14. This result was not surprising *per se* as multiple

drug-dependent and drug-independent events are known to activate PA5471 expression, as far as the translational machinery is perturbed . Since the *mexXY* operon is activated via a transcription attenuation mechanism involving the nucleotide sequence of the leader peptide PA5471.1 when ribosomes are stalling , we made the assumption that some ribosome-perturbing mutations might affect protein synthesis and growth rates. Indeed, alteration of *rplA*, *rplY*, *fmt*, *fold*, or *rplU-rpmA* promoter region negatively impacts the fitness of *P. aeruginosa* (7, 26, 27, 44). Consistent with our hypothesis, 5 of the 8 clinical strains (2405, 2946, 3136, 3564, 5013) exhibited either a longer lag phase, slower growth rates, and/or earlier onset of stationary phase than PAO1 at 37°C (Fig. 2A). The deficient fitness of these strains was much more evident when the incubation was performed at 44°C (Fig. 2B), a condition which almost inhibited their growth. The characterization of ribosomal mutations responsible for MexXY derepression in strains 3136, 3564, and PAOW1 is currently in progress (not published). Contrasting with these findings, the 3 remaining strains 3452, 4192, and 4592 multiplied like PAO1 at both temperatures (Fig. 2A and 2B), suggesting that all the PA5471-inducing mutations are not necessarily associated with a significant fitness cost for *P. aeruginosa*.

A deletion in PA5471.1 leads to upregulation of PA5471. Sequencing of the 367-bp intergenic region between PA5472 and PA5471 did not reveal mutations in the *agrW1* strains except in 4192 where the 42-bp coding sequence of leader peptide gene PA5471.1 was found to be disrupted by a 7-bp deletion (Δ 16-22). In light with this, Morita *et al.* demonstrated by *in vitro* site-directed mutagenesis that interference with gene PA5471.1 translation results in PA5471 gene overexpression in strain PAO1 . In the absence of mutations (e.g., generating premature stop codons), the wild-type PA5471.1 transcript was predicted to be involved in a stem-loop structure (named PA5471.1-2) on the nascent mRNA ahead of gene PA5471, that

co-exists with a second stem-loop (PA5471.1 3-4) with characteristics of putative transcription terminators. This presumed structure would prevent the transcription of the PA5471-70 operon . Because the 7-bp deletion found in strain 4192 would preclude the formation of the proposed PA5471.1-2 structure, other mRNA base-pairing rearrangements might lead to the disruption of the uracyl-rich transcription terminator and promote high-level constitutive expression of genes PA5471-70 . If confirmed, the mechanism found in strain 4192 would artificially reproduce some of the conformational changes occurring in the leader region of PA5471 mRNA when the transcriptional and the translational rates are perturbed (uncoupled) by antibiotics.

AgrW2 type mutants. The 5 remaining strains (2756, 2794, 3562, 3726, 3728) showed increased transcript levels of genes PA1797 and *arnA* due to alteration of the sensor kinase ParS from two-component system ParRS . Confirming recent data on imipenem-resistant ICU strains , most of the mutations mapped in the periplasmic domain (R83K, L99P) or in the second transmembrane segment (L137P, V152A, A138T) of ParS known to be important for signal transduction. The A168V change harbored by strain 2756 was located in the HAMP (histidine kinase, adenylyl cyclase, methyl-accepting chemotaxis proteins and phosphatases) domain which physically connects the signal-sensing/tranducing input functions of periplasmic and transmembrane regions to the kinase output functions of the cytoplasmic domain . It should be noted that mutations at positions L137 and A138 have already been associated with ParRS-dependent *mexXY* overexpression in clinical strains. Of note A138T co-existed with R83K in strain 3728, indicating that several mutations may accumulate in the *parS* gene. To confirm the role played by the aforementioned mutations in *mexXY* operon upregulation, the mutated *parRS* loci were cloned and inserted as single copies in the *attB* site of PAO1 Δ *parRS* (mutant CM096) chromosome. As expected, the mutated *parRS* increased

the resistance of CM096 to some or all of the MexXY/OprM substrates tested as well as to imipenem, a result consistent with the observation that when activated the two-component system ParRS negatively regulates the porin OprD gene expression and thus promotes carbapenem resistance (Table S2). In contrast, the ParS sequence polymorphism found in strains 2946 (R155H) and 3136 (A82T) did not influence the CM096 resistance levels significantly, suggesting no or faint activation of ParS in these strains though the mutations lie in the HAMP and the periplasmic sensor domains, respectively and despite a modest overexpression of genes PA1797 and *arn* in strain 2946 (Tables S2 and 4). Finally, as noted previously, mutational activation of ParRS was accompanied in some clinical *agrW2* strains by a marginal increase in colistin MIC (from 2 to 4-fold that for PAO1, Table 4).

Conclusions. The present study shows that a variety of specific and aspecific mutations affecting three distinct regulatory pathways actually lead to the overexpression of efflux system MexXY and to increased aminoglycoside resistance in clinical strains of *P. aeruginosa*. These pathways involve the local repressor MexZ (*agrZ*-type mutants), the MexZ anti-repressor ArmZ (*agrW1*-type) and the two-component regulatory system ParRS (*agrW2*-type). Consistent with previous data (8, 19, 20, 22, 23, 39, 46-51), we found here that most of the clinical MexXY-overproducing strains harbored mutations inactivating gene *mexZ* or compromising the activity of its product through amino acid substitutions concentrating in positions that are conserved in TetR regulators, including the DNA-binding and the dimerization domains (Fig. S1). More surprising was the observation that *agrW1* mutants may survive in the clinical setting while being deficient in protein synthesis. With one exception, such mutants have not been reported to infect or colonize patients before. Unfortunately, the clinical data associated with our collection were not sufficient to determine if some *agrW1* mutants remain pathogenic (i.e., responsible for infections and not just colonizations). One

could imagine that those with unaffected growth rates may retain the ability to multiply actively in the immuno-compromised host. Although there is an increasing evidence that multiple ribosome targetting mutations may result in PA5471-dependent upregulation of *mexXY* (7, 26-28), it is clear from this study that mutational disruption of the leader peptide PA5471.1 coded by the untranslated region (5'UTR) upstream of gene PA5471 can also be exploited by *P. aeruginosa* to develop multidrug resistance. Other examples of mutation-driven shortcuts in ribosome-mediated attenuation of resistance genes have been reported in other organisms (e.g., *ermC*) . Whether the 7-bp deletion characterized in strain 4192 prevents the formation of a terminator-like stem-loop ahead of operon *mexXY* or forces the ribosome to pause then allowing *mexXY* transcription is unclear at the moment. Finally, this work confirms the clinical relevance of *agrW2* mutants, which combine an efflux-based resistance to aminoglycosides, cefepime and ciprofloxacin, with a decreased outer membrane permeability to carbapenems . In agreement with this, similar mutants were recently isolated from patients in intensive care units . Finally, whether *agrW1* and *agrW2* strains also occur in cystic fibrosis patients in addition to the very prevalent *agrZ* mutants (48, 49) is currently not known and is worth further investigations to better understand how *P. aeruginosa* adapt to iterative aminoglycoside treatments in a context of chronic infection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Fabrice Poncet (SFR 4234, Besançon), Christiane Bailly and Justine Guerin (Laboratoire de Bactériologie, CHRU, Besançon) for their excellent technical assistance. We are also very grateful to Katy Jeannot for helpful discussions and suggestions.

369 This work was partially funded by the French Ministry of Health via the Institut de Veille
370 Sanitaire agency.
371

372 TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains, Plasmids	Phenotype or genotype	Reference or origin
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild-type reference strain PAO1 with resequenced genome	
PAOW1	PAO1 spontaneous mutant overexpressing MexXY	
PAOW2	PAO1 spontaneous mutant overexpressing MexXY with a M59I substitution in response regulator ParR	
CMZ091	PAO1 $\Delta mexZ$	
CM096	PAO1 $\Delta parRS$	
CM106	CM096 <i>cis</i> complemented with <i>parRS</i> from PAOW2; Tc ^r	
CM114	PAO1 $\Delta mexXY$	This study
CM115	PAO1 $\Delta oprM$	This study
CM116	CM096 <i>cis</i> complemented with <i>parRS</i> from PAO1; Tc ^r	This study
CM141	CM096 <i>cis</i> complemented with <i>parRS</i> from 2756; Tc ^r	This study
CM142	CM096 <i>cis</i> complemented with <i>parRS</i> from 2794; Tc ^r	This study
CM143	CM096 <i>cis</i> complemented with <i>parRS</i> from 2946; Tc ^r	This study
CM144	CM096 <i>cis</i> complemented with <i>parRS</i> from 3136; Tc ^r	This study
CM145	CM096 <i>cis</i> complemented with <i>parRS</i> from 3562; Tc ^r	This study
CM146	CM096 <i>cis</i> complemented with <i>parRS</i> from 3726; Tc ^r	This study
CM147	CM096 <i>cis</i> complemented with <i>parRS</i> from 3728; Tc ^r	This study
<i>E. coli</i>		
CC118	$\Delta(ara-leu) araD \Delta lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB$ <i>argE</i> (Am) <i>recA1</i>	
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>recA13 ara-14 pro A2 lacY1 galK2</i> Invitrogen <i>rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1</i>	

Plasmids

PCR2.1	Cloning vector for PCR products, <i>lacZ</i> ΔColE1 f1 <i>ori</i> , Ap ^r , Km Invitrogen
pRK2013	Helper plasmid, ColE1 <i>ori</i> , Tra ⁺ , Mob ⁺ , Km ^r
mini-CTX1	Self-proficient integration vector with <i>tet</i> , <i>Ω-FRT-attP</i> -MCS, <i>ori</i> , <i>int</i> , and <i>oriT</i> ; Tc ^r

373

374 ^aAntibiotic selection markers: Tc^r, tetracycline; Ap^r, ampicillin; Km^r, kanamycin.

375 Abbreviation: MCS, multiple cloning sites.

376

Nucleotidic sequence (5' → 3')	
Gene sequencing	
<i>mexZ</i> and intergenic region <i>mexX-mexZ</i>	
SeqZ1:	GCAGCCCAGCAGGAATAG
SeqZ2:	GCCTGTCGGTGCTCTACATC
<i>parRS</i>	
SeqparSC1:	GCCAGGCAGGGGAAATACT
SeqparSC2:	CATACCAGCAGGGCGGATG
SeqparSC3:	AAGAACCTGCTGGTGGTACG
SeqparSC4:	ATGCGGATCTGTTCGACCT
SeqparSC5:	CGAACTGGAGGAAATGGTCT
SeqparSC6:	GAAAGATGCATTGCACGAAA
SeqparRC1:	GCATATAATGCCAGCCGATT
SeqparRC2:	GGTCGACCACGAAGATCG
PA5471.1	
SeqPA5471.1S1:	GGAGTCCTTCATGACCTTCG
SeqPA5471.1S2:	GTGGTTTGCAGTTGCTGGAT
Cloning of genes <i>parRS</i> for <i>cis</i> complementation	
CloparRSC1:	GAGGGAAAAGCAGAAGTCACC
CloparRSC2:	CGAGGTGTCCCATGCTAGG
CloparRSBamHIS1:	CTCGGATCCGAGGGAAAAGCAGAAGTCACC
CloparRSHindIIIS2:	CTCAAGCTTCGAGGTGTCCCATGCTAGG
Gene expression measurement by RT-qPCR	
RT _{tps} L1:	GCAACTATCAACCAGCTGGTG

RTrpsL2: GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG

RTmexY1A: TTACCTCCTCCAGCGGC

RTmexY1B: GTGAGGCGGGCGTTGTG

RTPA5471C1: GAAGGCAAGGCGATCCAG

RTPA5471C2: AGGCGCTTTTCCAGTTTGT

RTPA1797C1: GGACCCTTTGCAGATGACTC

RTPA1797C2: CGGAGTGTTTCCTGAGAAGC

RTarnAC1: GTGGCTCGAATACCATGTGA

RTarnAC2: TGCCGTATTTACGCAGTAG

The recognition sequences of endonucleases BamHI and HindIII are underlined.

TABLE 3 Drug resistance levels ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of the 57 selected clinical isolates

Antibiotic	Clinical isolates					Reference strains			
	MIC range	Categorization (%) ^a			MIC50/MIC90	PAO1	CMZ091	PAOW1	PAOW2
		S	I	R					
Tobramycin	0.5-128	91	0	9	¼	0.5	1	2	1
Amikacin	4-64	84	14	2	16/32	4	8	16	8
Apramycin	16-256	nd	nd	nd	64/128	16	32	64	64
Ciprofloxacin	0.125-64	67	5	28	0.5/32	0.25	0.5	0.5	0.5
Cefepime	2-32	53	30	17	8/32	4	8	16	8
Ceftazidime	0.5-32	95	3	2	2/8	2	2	2	2
Ticarcillin	4->1,024	42	51	7	32/64	16	16	16	16

^a According the current CLSI breakpoints for tobramycin ($S \leq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$, $R \geq 16 \mu\text{g mL}^{-1}$), amikacin ($S \leq 16$, $R \geq 64$), ciprofloxacin ($S \leq 1$, $R \geq 4$), cefepime ($S \leq 8$, $R \geq 32$), ceftazidime ($S \leq 8$, $R \geq 32$), ticarcillin ($S \leq 16$, $R \geq 128$).

nd: not defined.

TABLE 4 Genetic and phenotypic features of the 8 *agrW1* and 5 *agrW2* clinical mutants

Strains	Genotype	Mutations	Mutations	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)								Expression levels ^a			
		in ParR	in ParS	TOB	AMK	APR	CIP	FEP	CAZ	TIC	CST	<i>mexY</i>	<i>PA5471</i>	<i>PA1797</i>	<i>arnA</i>
PAO1	wild-type			0.5	4	16	0.25	4	2	16	1	1	1	1	1
PAOW1	<i>agrW1</i>			2	16	64	0.5	16	2	16	1	15.2	6.1	-1.2	1.0
PAOW2	<i>agrW2</i>	M59I		1	8	64	0.5	8	2	16	2	16.0	-1.6	92.9	104.7
2405	<i>agrW1</i>			4	64	128	0.5	8	2	32	1	39.5	6.0	1.2	-5.0
2946	<i>agrW1</i>		R155H ^b	1	16	32	1	16	2	64	1	35.9	4.8	6.3	4.6
3136	<i>agrW1</i>		A82T ^b	2	32	128	0.5	8	2	32	1	18.2	3.5	-1.2	-1.4
3452	<i>agrW1</i>			4	32	256	32	8	2	32	1	16.2	10.1	3.3	-2.2
3564	<i>agrW1</i>			4	32	256	0.5	8	1	16	1	43.9	5.0	-1.2	-1.4
4192	<i>agrW1</i>			1	8	32	0.5	8	2	32	1	44.7	15.6	-1.2	-1.6
4592	<i>agrW1</i>			2	16	64	4	16	16	64	1	16.9	4.6	1.1	2.1
5013	<i>agrW1</i>			1	16	64	1	16	4	32	1	51.3	7.4	4.0	-1.4
2756	<i>agrW2</i>		A168V ^c	1	16	32	2	16	4	64	1	8	-1.1	12.0	96.3
2794	<i>agrW2</i>		L99P ^c	4	16	128	2	32	4	32	2	28.7	1.3	40.7	17.6

3562	<i>agrW2</i>	L137P ^c	128 ^d	32	64	0.5	16	4	>1,024 ^d	4	8.0	-1.1	3.0	98.7
3726	<i>agrW2</i>	V152A ^c	2	16	64	0.5	8	2	16	1	10.5	1.4	27.9	28.7
3728	<i>agrW2</i>	R83K,A138T ^c	2	16	64	1	8	2	16	2	4.3	1.2	4.6	11.0

^a Mean values of two independent experiments expressed as ratios to PAO1 expression levels

^b Amino acid change with no effect on protein function, as demonstrated by gene *cis*-complementation of mutant PAO1Δ*parRS*, CM096 (Table S1)

^c Amino acid change activating sensor ParS (Table S1)

^d Probable enzymatic mechanism of resistance

Abbreviations: TOB, tobramycin; AMK, amikacin; APR, apramycin; CIP, ciprofloxacin; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidime; TIC, ticarcillin; CST, colistin.

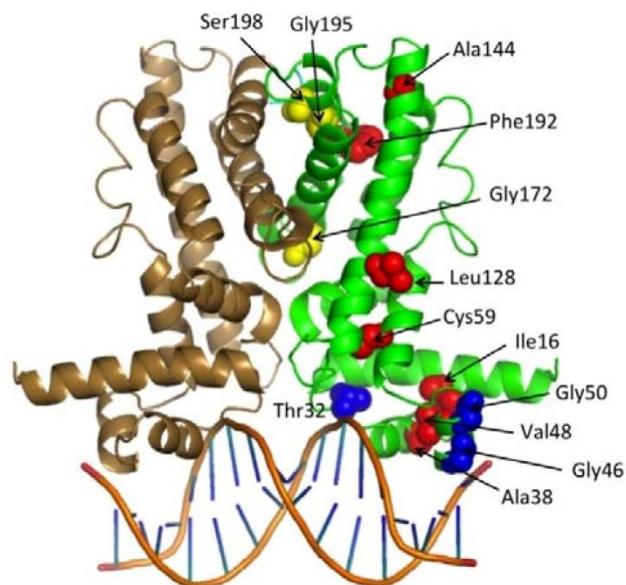


FIG 1 Three dimensional illustration of MexZ mutations, localized on the MexZ/DNA model built for this study. The two molecules of the dimer are colored in green and brown, respectively. Residues are represented by spheres in yellow for those located at the dimer interface, in blue for those located at the protein/DNA interface and in red for all the others.

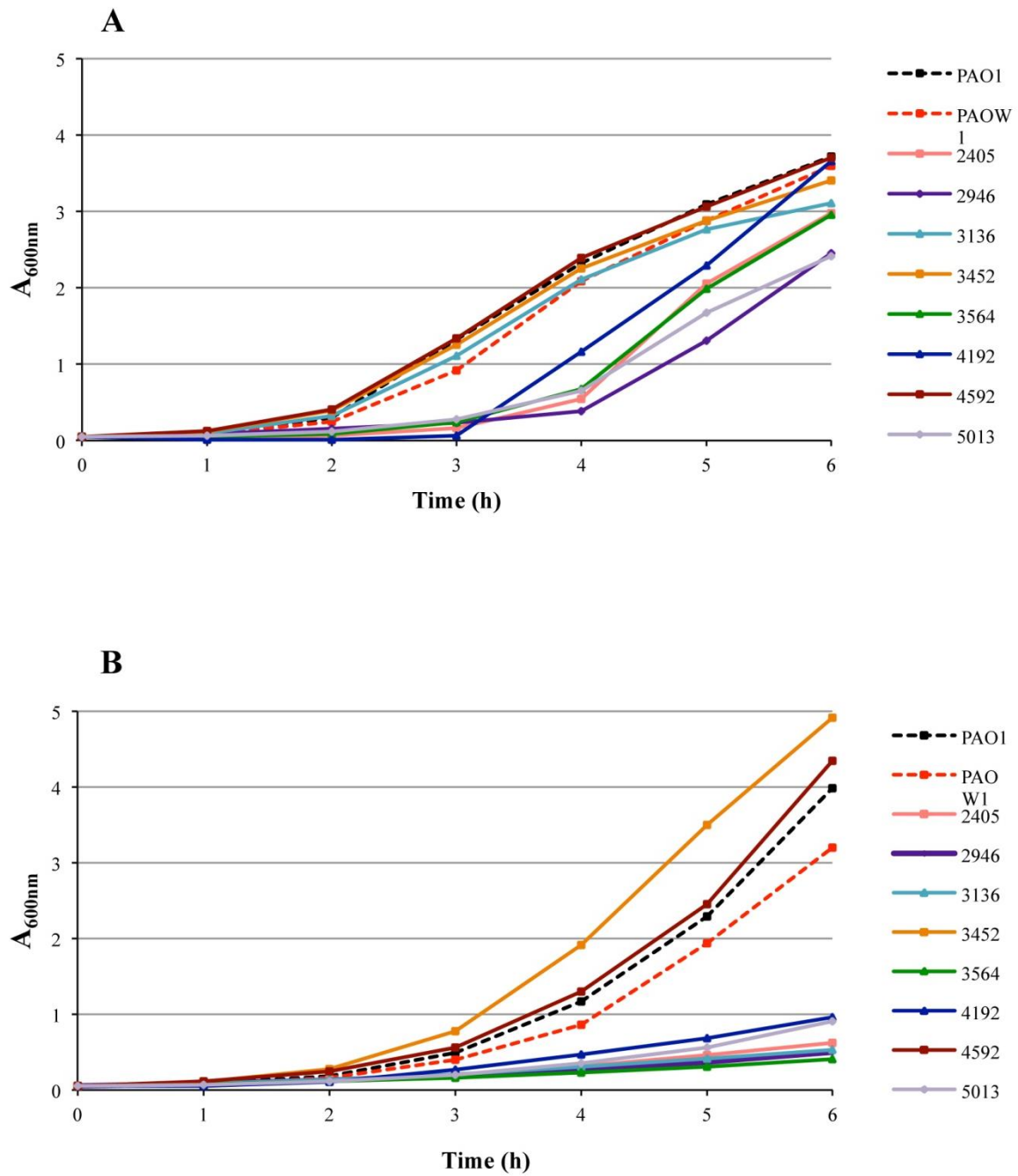


FIG 2 Representative growth curves of *agrW1* mutants at 37°C (A) and 44°C (B). Bacteria were cultured in triplicates in MHB with an initial inoculum of 0.1 at A_{600nm} .

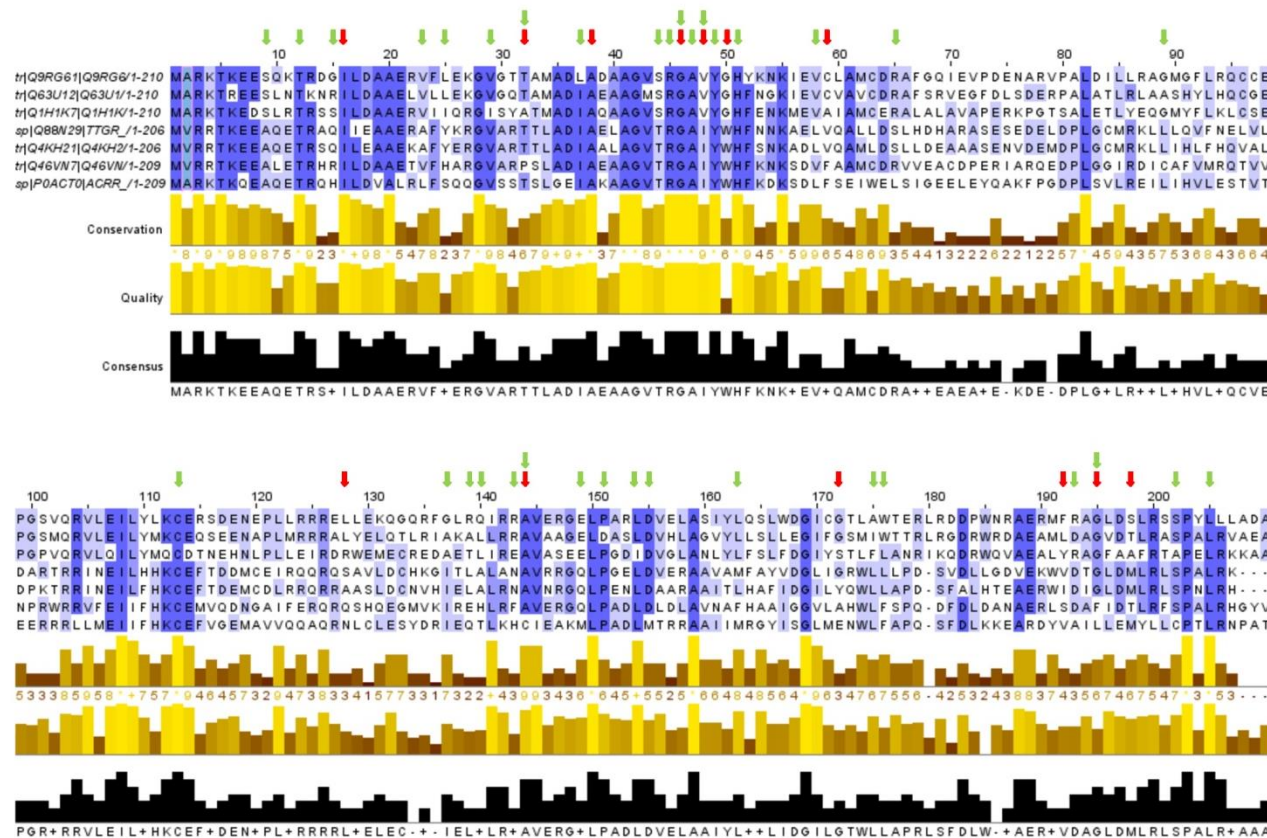


FIG S1 Alignment of protein MexZ with various TetR-like homologs (AmrR from *Burkholderia pseudomallei*, Q1H1K7 from *Methylobacillus flagellus*, TtgR from *Pseudomonas putida*, EmhR from *Pseudomonas fluorescens*, Q46VN7 from *Cupriavidus pinatubonensis*, AcrR from *Escherichia coli*). Red arrows represent the mutations found in this study in protein MexZ. Mutations reported in the literature as associated with *mexXY* overexpression are indicated by green arrows (1-12)

TABLE S1 Drug susceptibilities, mutations and *mexY* expression levels of the 44 clinical *agrZ* mutants.

Strains	Genotype	Mutations in <i>mexZ</i>	Protein MexZ	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							<i>mexY</i> levels ^a
				TOB	AMK	APR	CIP	FEP	CAZ	TIC	
PAO1	Wild-type			0.5	4	16	0.25	4	2	16	1
CMZ091	PAO1 Δ <i>mexZ</i>	(-) ^b 627 bp	(-)209 amino acids	1	8	32	0.5	8	2	16	30.6
2283	<i>agrZ</i>	T47C	I16T	1	32	64	8	16	2	16	36.7
2338	<i>agrZ</i>	G136A	G46S	1	8	32	0.5	8	2	32	21.5
2404	<i>agrZ</i>	(+) ^c 1 bp (203-204) ^d	aberrant	1	16	64	1	32	2	16	15.3
2477	<i>agrZ</i>	(-)10 bp (328-337)	aberrant	1	8	32	0.5	32	4	16	15.1
2508	<i>agrZ</i>	GC584-585AA	G195E	128 ^e	8	32	32	16	4	32	18.9
2509	<i>agrZ</i>	(+)1 bp (128-129)	aberrant	128 ^e	8	32	>16	16	8	256	11.7
2529	<i>agrZ</i>	(+)1 bp (415-416)	aberrant	2	8	32	0.5	16	2	32	38.9
2657	<i>agrZ</i>	C28T	Q10stop	1	8	32	0.5	32	4	32	18.4
2696	<i>agrZ</i>	(-)2 bp (151-152)	aberrant	1	16	128	1	32	4	32	65.2

2752	<i>agrZ</i>	(+)7 bp (292-293)	aberrant	1	16	64	32	32	8	64	27.1
2843	<i>agrZ</i>	C431T	A144V	0.5	4	32	0.5	8	2	16	15.2
2855	<i>agrZ</i>	(+)2 bp (358-359)	aberrant	1	16	32	32	32	8	128	19.0
2882	<i>agrZ</i>	(-)1 bp (399)	aberrant	128 ^e	8	32	1	16	2	16	42.7
2914	<i>agrZ</i>	(-)13 bp (291-303)	aberrant	1	8	64	2	32	8	128	35.2
3028	<i>agrZ</i>	(+)7 bp (438-439)	aberrant	1	8	32	64	16	4	64	38.3
3060	<i>agrZ</i>	T143C	V48A	1	8	64	32	16	4	64	23.0
3103	<i>agrZ</i>	(-)13 bp (566-578)	aberrant	4	32	256	1	16	4	16	69.1
3135	<i>agrZ</i>	C382A	L128M	1	8	32	0.5	8	2	32	21.9
3197	<i>agrZ</i>	(+)5 bp (519-520)	aberrant	4	32	256	8	8	2	32	24.0
3215	<i>agrZ</i>	(+)2 bp (237-238)	aberrant	2	16	64	0.5	8	0.5	4	33.1
3229	<i>agrZ</i>	G149A	G50D	2	8	64	0.5	16	4	32	35.1
3245	<i>agrZ</i>	G515A, T575A	G172D, F192Y	2	16	64	32	16	4	32	18.4
3259	<i>agrZ</i>	(-)1 bp (276)	aberrant	1	8	64	0.5	8	2	16	16.3
3359	<i>agrZ</i>	(-)21 bp (363-383)	aberrant	1	8	32	0.5	4	0.5	16	19.2
3723	<i>agrZ</i>	(-)18 bp (566-583)	aberrant	1	8	32	0.5	8	2	16	28.1

4037	<i>agrZ</i>	(-)13 bp (512-524)	aberrant	1	8	32	0.5	8	2	16	15.0
4173	<i>agrZ</i>	G176A	C59Y	2	16	64	0.5	8	2	16	13.5
4194	<i>agrZ</i>	C490T	Q164stop	4	32	128	1	32	32	64	32.4
4364	<i>agrZ</i>	(-)1 bp (102)	aberrant	2	16	64	1	8	2	16	52.9
4465	<i>agrZ</i>	C95A, G593T	T32N, S198I	2	16	64	0.125	8	2	32	25.9
4484	<i>agrZ</i>	(-)19 bp (585-598)	aberrant	2	16	64	0.5	16	2	16	42.0
4634	<i>agrZ</i>	C113T	A38V	128 ^e	16	256	16	8	16	64	30.4
4678	<i>agrZ</i>	(-)2 bp (562-563)	aberrant	1	8	32	4	16	2	16	18.9
4753	<i>agrZ</i>	whole gene deletion	no protein	1	16	64	0.5	32	8	64	60.2
4782	<i>agrZ</i>	(+)3 bp (176-177)	aberrant	1	8	32	0.25	16	2	32	31.9
4869	<i>agrZ</i>	(-)42 bp (174-215)	aberrant	1	8	64	0.25	8	2	16	nd ^f
4870	<i>agrZ</i>	(-)1 bp (103)	aberrant	1	8	32	0.5	8	2	32	15.6
4891	<i>agrZ</i>	(+)5 bp (99-100)	aberrant	2	16	128	4	8	2	8	62.3
4931	<i>agrZ</i>	(+)2 bp (576-577)	aberrant	1	8	32	16	8	4	64	38.9
4974	<i>agrZ</i>	(-)17 bp (528-544)	aberrant	1	8	32	0.5	8	0.5	4	22.8
4993	<i>agrZ</i>	(-)18 bp (406-423)	(-)6 amino acids	1	8	32	1	8	2	32	20.0

4994	<i>agrZ</i>	(-)6 bp (453-458)	aberrant	2	16	64	0.5	8	2	4	20.0
5003	<i>agrZ</i>	(+)1 bp (630-631)	aberrant	0.5	8	16	32	8	2	8	10.9
5020	<i>agrZ</i>	A334T	K112stop	0.5	8	16	0.5	8	2	16	24.3

^aMean values of two independent experimentations each including two determinations

^bDeletion, ^caddition/insertion, ^dnucleotide positions referring to the PAO1 base sequence

^eprobable enzymatic resistance to tobramycin

^fnot determined because of lack of PCR amplification

Abbreviations: TOB, tobramycin; AMK, amikacin; APR, apramycin; CIP, ciprofloxacin; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidime; TIC, ticarcillin.

TABLE S2 Drug susceptibility of the PAO1 $\Delta parRS$ mutant *cis*-complemented with full length *parRS*.

Strains	Genotype	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a					
		GEN	AMK	CIP	FEP	IMP	CST
PAO1	wild-type <i>parRS</i>	2	8	0.25	4	2	2
CM096	PAO1 $\Delta parRS$	2	8	0.25	2	2	1
CM116	CM096:: <i>parRS</i> _{PAO1}	2	8	0.25	2	2	1
CM106	CM096:: <i>parRS</i> _{PAOW2}	4	16	0.5	8	4	2
CM141	CM096:: <i>parRS</i> ₂₇₅₆	4	16	0.5	8	8	2
CM142	CM096:: <i>parRS</i> ₂₇₉₄	4	16	0.5	8	4	2
CM143	CM096:: <i>parRS</i> ₂₉₄₆	2	8	0.25	2(4)	2(4)	2
CM144	CM096:: <i>parRS</i> ₃₁₃₆	2	8	0.25	2	2	1
CM145	CM096:: <i>parRS</i> ₃₅₆₂	4	16	0.5	8	4	2
CM146	CM096:: <i>parRS</i> ₃₇₂₆	4	16	0.5	8	8	2
CM147	CM096:: <i>parRS</i> ₃₇₂₈	2	8	0.5	4	4	2

^a Individual MICs values were found identical in two independent determinations except those given in brackets.

MIC values in boldface are at least twofold higher than those for wild-type parent strain PAO1.

Abbreviations: GEN, gentamicin; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin; FEP, cefepime; IMP, imipenem; CST, colistin.

REFERENCES

1. **Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND.** 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin. Microbiol. Rev. **22**:582-610.
2. **Ramos Aires J, Köhler T, Nikaido H, Plésiat P.** 1999. Involvement of an efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:2624-2628.
3. **Dean CR, Visalli MA, Projan SJ, Sum P-E, Bradford PA.** 2003. Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:972-978.
4. **Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T.** 2000. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:2242-2246.
5. **Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T.** 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:3322-3327.
6. **Mine T, Morita Y, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T.** 1999. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:415-417.
7. **Westbrock-Wadman S, Sherman DR, Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warrenner P, Nguyen LY, Shawar RM, Folger KR, Stover CK.** 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:2975-2983.
8. **Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Morrow BJ, Davies TA, Foleno BD, He W, Queenan AM, Bush K.** 2009. Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:2785-2790.
9. **Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plésiat P.** 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:1347-1351.
10. **Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P.** 2005. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. J. Bacteriol. **187**:5341-5346.

11. **Poole K, Heinrichs DE, Neshat S.** 1993. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* **10**:529-544.
12. **Gotoh N, Tsujimoto H, Poole K, Yamagishi JI, Nishino T.** 1995. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2567-2569.
13. **Morita Y, Sobel ML, Poole K.** 2006. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. *J. Bacteriol.* **188**:1847-1855.
14. **Morita Y, Gilmour C, Metcalf D, Poole K.** 2009. Translational control of the antibiotic inducibility of the PA5471 gene required for *mexXY* multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **191**:4966-4975.
15. **Yamamoto M, Ueda A, Kudo M, Matsuo Y, Fukushima J, Nakae T, Kaneko T, Ishigatsubo Y.** 2009. Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of *mexXY* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **155**:3312-3321.
16. **Hay T, Fraud S, Lau CH-F, Gilmour C, Poole K.** 2013. Antibiotic inducibility of the *mexXY* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the MexZ anti-repressor ArmZ. *PLoS One* **8**:e56858.
17. **Matsuo Y, Eda S, Gotoh N, Yoshihara E, Nakae T.** 2004. MexZ-mediated regulation of *mexXY* multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the *mexZ-mexX* intergenic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**:23-28.
18. **Sobel ML, Hocquet D, Cao L, Plésiat P, Poole K.** 2005. Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in lab and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1782-1786.
19. **Vogne C, Ramos Aires J, Bailly C, Hocquet D, Plésiat P.** 2004. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1676-1680.
20. **Campo Esquisabel AB, Rodriguez MC, Campo-Sosa AO, Rodriguez C, Martinez-Martinez L.** 2011. Mechanisms of resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* less susceptible to cefepime than to ceftazidime. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**:1817-1822.

21. **Sobel ML, McKay GA, Poole K.** 2003. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3202-3207.
22. **Islam S, Jalal S, Wretling B.** 2004. Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:877-883.
23. **Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P.** 2004. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1797-1802.
24. **Muller C, Plésiat P, Jeannot K.** 2011. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:1211-1221.
25. **Pasca MR, Dalla Valle C, De Jesus Lopes Ribeiro AL, Buroni S, Papaleo MC, Bazzini S, Udine C, Incandela ML, Daffara S, Fani R, Riccardi G, Marone P.** 2012. Evaluation of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistance clinical isolates. *Microb. Drug Resist.* **18**:23-32.
26. **Lau CH-F, Fraud S, Jones M, Peterson SN, Poole K.** 2012. Reduced expression of the *rplU-rpmA* ribosomal protein operon in *mexXY*-expressing pan-aminoglycoside-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:5171-5179.
27. **El Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plésiat P.** 2007. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1016-1021.
28. **Caughlan RE, Sriram S, Daigle DM, Woods AL, Bucu J, Peterson RL, Dzink-Fox J, Walker S, Dean CR.** 2009. Fmt bypass in *Pseudomonas aeruginosa* causes induction of MexXY efflux pump expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:5015-5022.
29. **Fournier D, Richardot C, Müller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plésiat P, Jeannot K.** 2013. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:in press.
30. **Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR.** 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **77**:7347-7351.

31. **CLSI.** 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard - 7th edition.
32. **Alguel Y, Lu D, Quade N, Sauter S, Zhang X.** 2010. Crystal structure of MexZ, a key repressor responsible for antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Struct. Biol. **172**:305-310.
33. **Orth P, Schnappinger D, Hillen W, Saenger W, Hinrichs W.** 2000. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. Nat. Struct. Biol. **7**:215-219.
34. **Emsley P, Cowtan K.** 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. **60**:2126-2132.
35. **Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ.** 2009. Jalview version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics **25**:1189-1191.
36. **Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP.** 2000. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. Plasmid **43**:59-72.
37. **Dumas J-L, vanDelden C, Perron K, Köhler T.** 2006. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. FEMS Microbiol. Lett. **254**:217-225.
38. **Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, Köhler T, van Delden C, Weinel C, Slickers P, Tümmler B.** 2007. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **19**:8101-8106.
39. **Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodriguez C, Moyà B, Pena C, Martinez-Martinez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** 2012. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Antimicrob. Agents Chemother. **56**:6349-6357.
40. **Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B.** 2007. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:4062-4070.
41. **Schumacher MA, Brennan RG.** 2002. Structural mechanisms of multidrug recognition and regulation by bacterial multidrug transcription factors. Mol. Microbiol. **45**:885-893.

42. **Le TBK, Schumacher MA, Lawson DM, Brennan RG, Buttner MJ.** 2011. The crystal structure of the TetR family transcriptional repressor SimR bound to DNA and the role of a flexible N-terminal extension in minor groove binding. *Nucleic Acids Res.* **39**:9433-9447.
43. **Morita Y, Tomida J, Kawamura Y.** 2012. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **3**:doi:10.3389.
44. **Newton DT, Creuzenet C, Mangroo D.** 1999. Formylation is not essential for initiation of protein synthesis in all eubacteria. *J. Biol. Chem.* **274**:22143-22146.
45. **Williams SB, Stewart V.** 1999. Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction. *Mol. Microbiol.* **33**:1093-1102.
46. **Qin X, Zerr DM, McNutt MA, Berry JE, Burns JL, Kapur RP.** 2012. *Pseudomonas aeruginosa* synthrophy in chronically colonized airways of cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:5971-5981.
47. **Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K.** 2010. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **192**:6191-6199.
48. **Feliziani S, Lujan AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, Montanaro P, Fernández Canigia L, Argaraña CE, Smania AM.** 2010. Mucoïdy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS One* **5**:e12669.
49. **Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV.** 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **103**:8487-8492.
50. **Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, Nordmann P, Vincent JL, Struelens MJ.** 2005. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1198-1204.
51. **Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plésiat P.** 2011. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:5676-5684.
52. **Werckenthin C, Schwarz S, Westh H.** 1999. Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed *ermC* genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1681-1685.

53. **Manoil C, Beckwith J.** 1985. *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **82**:8129-8133.

5. Résultats complémentaires à l'article 2

5.1. Altération de l'ARN 23S et génotype *agrW1*

Au laboratoire, la mise en culture de la souche PAO1 sur des milieux gélifiés renfermant de l'amikacine ou de la dihydrostreptomycine a permis d'isoler deux mutants de type *agrW1*, respectivement PAOW1 et KJD9. Afin de mieux caractériser ces mutants, le séquençage complet de leurs génomes ainsi que celui de la souche PAO1 a été entrepris, révélant l'altération de deux des quatre allèles codant pour l'ARN23S (Muller *et al.* en préparation) (**Figure 24**).

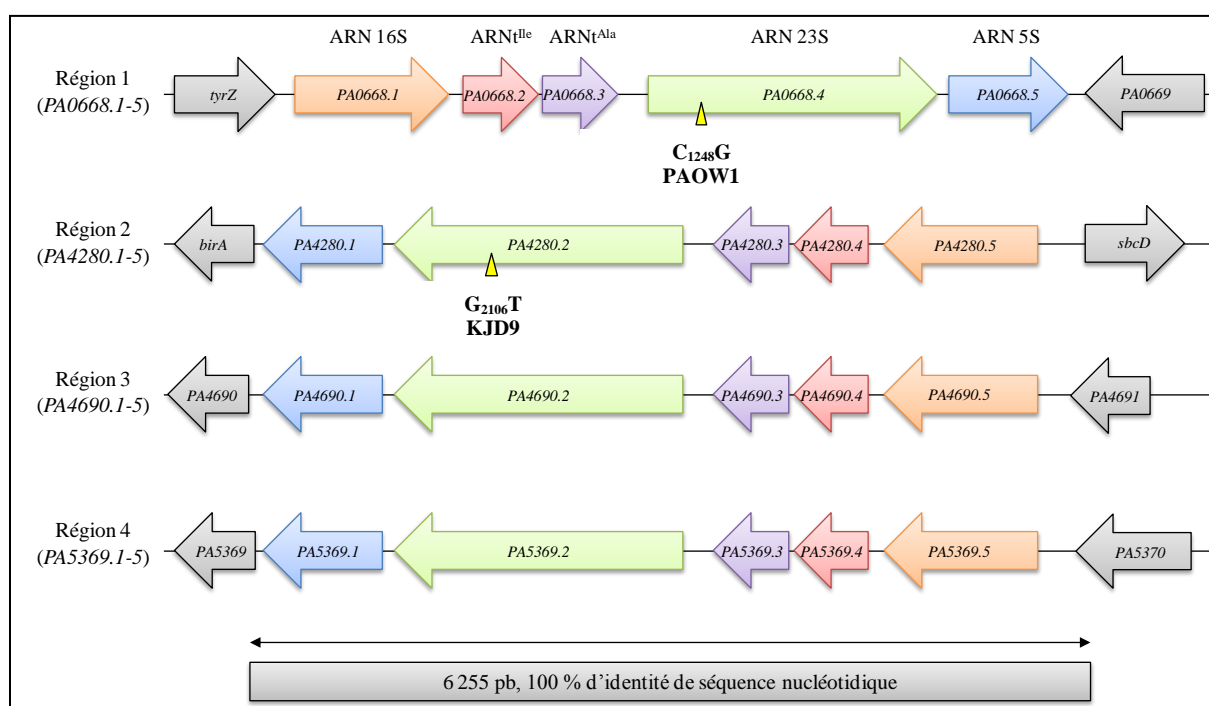


Figure 24. Représentation schématique des 4 allèles codant pour l'ARN ribosomal de la souche PAO1.

Les triangles jaunes représentent les mutations identifiées chez les mutants PAOW1 et KJD9. Les gènes codant pour les ARNr 16S, 23S et 5S sont indiqués respectivement en orange, vert et bleu. En rose et en violet sont indiqués les gènes codant pour les ARNt Ile et Ala respectivement. En noir sont représentés les gènes situés directement en aval et en amont de chaque région.

Le chromosome de *P. aeruginosa* possède 4 régions (*PA0668.1-5*, *PA4280.1-5*, *PA4690.1-5* et *PA5369.1-5*) strictement identiques codant chacune pour les ARNr 5S, 16S et 23S ainsi que pour deux ARN de transfert (ARNt^{Ala} et ARNt^{Ile}). La mutation identifiée chez PAOW1 correspond à la position C₁₂₆₁ chez *E. coli* qui se situe à proximité d'une séquence du domaine II (1262-1270) supposée interagir avec la séquence 2010-2017 située à cheval sur les domaines IV et V pour former une hélice irrégulière au cœur de l'ARNr 23S et permettre le

rapprochement des domaines en question (**Figure 25**) (Aagaard and Douthwaite, 1994). Il a été démontré que des substitutions affectant les nucléotides A₁₂₆₂ et U₂₀₁₇ de l'ARN 23S de *E. coli* ne perturberaient pas la formation de la sous-unité 50S (ARNr 5S, ARNr 23S, protéines L1 à L34) mais déstabiliserait son interaction avec la sous-unité 30S empêchant ainsi le ribosome de s'engager dans la synthèse protéique. Ainsi, la mutation présente chez PAOW1 pourrait perturber la stabilité du ribosome. La mutation identifiée chez le mutant KJD9 (correspondant à la position G₂₁₂₀ chez *E. coli*) a, quant à elle, été localisée au niveau du site de fixation de la protéine L1, laquelle participe à la formation de la sous-unité 50S et contribuerait à la libération de l'ARNt désacylé du site E (Harms *et al.*, 2001). Ainsi, chez KJD9, l'assemblage de la sous-unité 50S serait perturbé empêchant ainsi le ribosome de fonctionner de façon optimale. Bien que majeur, l'impact de ces deux mutations identifiées n'est cependant pas létal car partiellement compensé par les 3/4 des ribosomes restés intacts. L'entrée plus tardive en phase exponentielle des deux mutants à 37°C et 44°C confirme l'effet du dysfonctionnement ribosomal sur la croissance bactérienne (**Figure 26**).

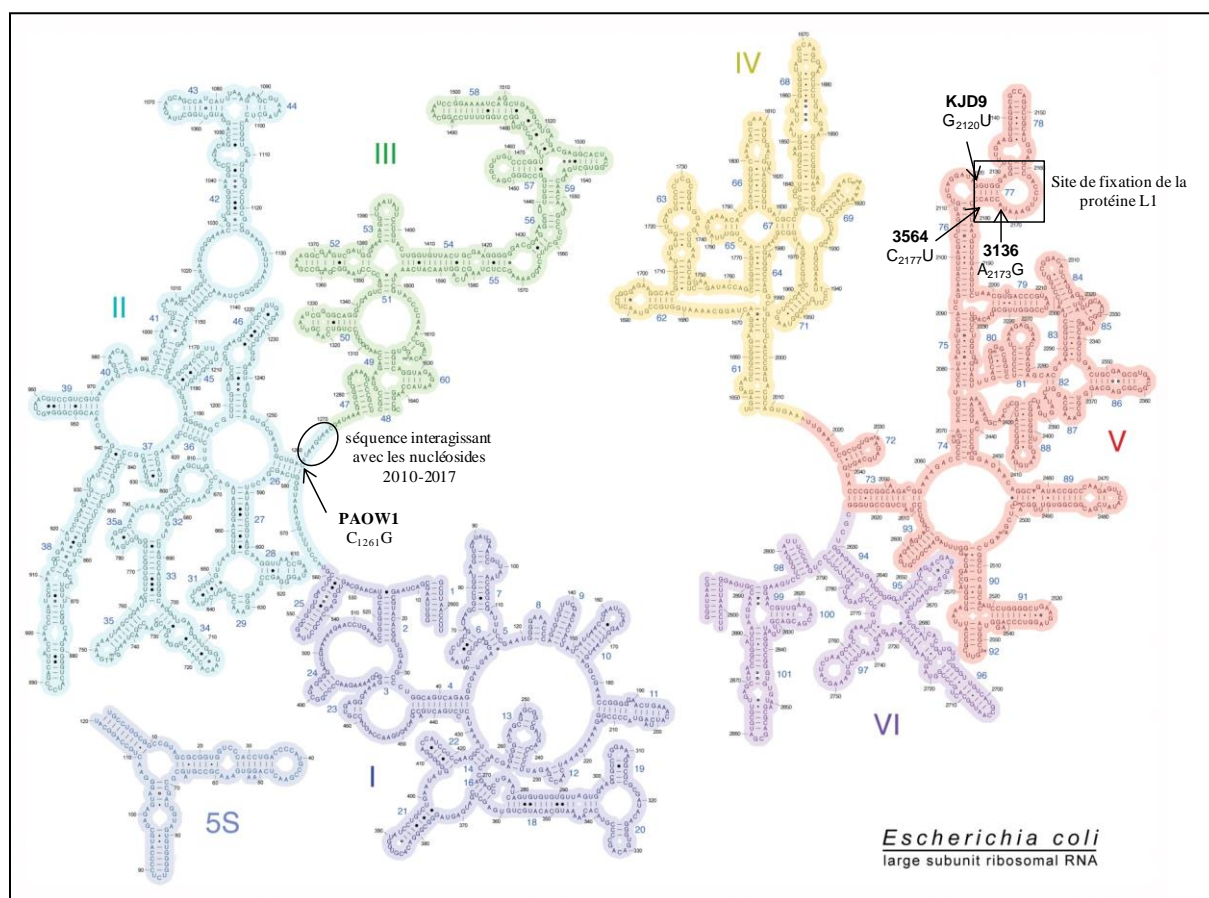


Figure 25. Localisation des mutations dans l'ARN 23S identifiées chez les mutants sélectionnés *in vitro* (PAOW1 et KJD9) et chez les souches cliniques 3136 et 3564.

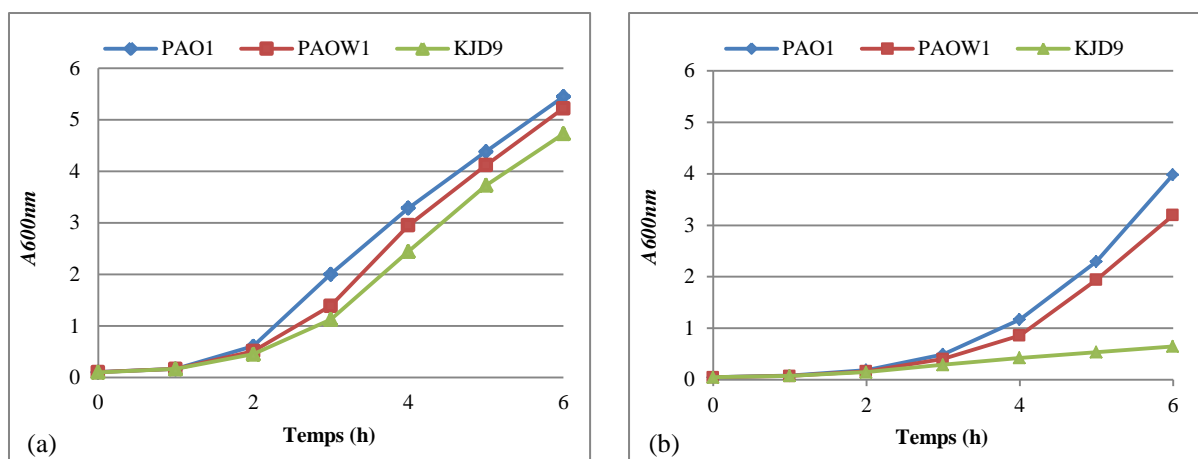


Figure 26. Courbes de croissance de la souche PAO1 et des mutants PAOW1 et KJD9 à 37°C (a) et 44°C (b).

Afin d'identifier les gènes dont l'expression est modifiée chez les mutants PAOW1 et KJD9, une étude transcriptomique a été réalisée. Parmi les 80 (PAOW1) et 106 gènes (KJD9) présentant des modifications d'expression par rapport à la souche PAO1, 55 sont apparus communs aux deux isolats, comme par exemple les gènes surexprimés *PA1425*, *pscF*, et *exoY* codant respectivement pour un probable ABC transporteur, la sous-unité formant l'aiguille du SST3 et une exotoxine injectée par ce système. En accord avec ces résultats, les mutants PAOW1 et KJD9 se sont révélés 1,5 à 2 fois plus cytotoxiques que la souche PAO1, sur une lignée de macrophages, J774.1 (*Muller et al.* en préparation).

Ainsi, nous avons voulu savoir si des altérations de l'ARN 23S pouvaient être responsables de la surexpression de *PA5471* chez nos isolats cliniques *agrW1*. Hormis la souche 4192 porteuse d'une délétion de 7 nucléotides dans le gène *PA5471.1*, 5 des 7 isolats restants ont présenté, comme PAOW1 et KJD9, des retards de croissance à 37°C et 44°C.

Le séquençage des quatre allèles codant pour l'ARN 23S a été effectué sur quatre souches (2946, 3136, 3564 et 5013) surexprimant au moins 2 des gènes suivants *PA1425*, *pscF* et *exoY*, et montrant un retard de croissance (**Tableau 18**) (**Figure 2, Article 2**).

C'est ainsi que nous avons pu rattacher la surexpression du gène *PA5471* et de l'opéron *mexXY* à des mutations localisées dans 2 des allèles codant pour l'ARN ribosomal 23S chez 2 souches cliniques. Il s'agit des mutations A₂₁₆₀G allèle 1 (souche 3136) et C₂₁₆₃T allèle 4 (souche 3564) correspondant aux positions A₂₁₇₃ et C₂₁₇₇ chez *E. coli* (**Figure 25**). A noter que les deux mutations se situent, comme celle de KJD9, au niveau du site de fixation de la protéine L1 sur l'ARN 23S.

Tableau 18. Analyse de l'expression des gènes connus pour être activés lorsque la sous-unité 23S du ribosome est altérée et phénotype de croissance des souches cliniques *agrW1*.

Souches	Quantité relative des transcrits ^a					Retard de croissance	
	<i>mexY</i>	<i>PA5471</i>	<i>PA1425</i>	<i>pscF</i>	<i>exoY</i>	37°C	44°C
PAOW1	<u>15,2</u>	<u>8,8</u>	<u>19,5</u>	<u>10,9</u>	<u>4,8</u>	+	+
KJD9	<u>10,9</u>	<u>9,0</u>	<u>16,8</u>	<u>16,8</u>	<u>10,0</u>	+	+++
2405	<u>39,5</u>	<u>6,0</u>	1,3	-2,0	1,7	+++	+++
2946	<u>35,9</u>	<u>4,8</u>	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	<u>11,3</u>	+++	+++
3136	<u>18,2</u>	<u>3,5</u>	1,1	<u>2,2</u>	<u>6,4</u>	+	+++
3452	<u>16,2</u>	<u>10,1</u>	<u>6,0</u>	1,4	<u>3,7</u>	0	0
3564	<u>43,9</u>	<u>5,0</u>	-1,4	<u>6,3</u>	<u>6,0</u>	+++	+++
4192	<u>44,7</u>	<u>15,6</u>	-10,0	3,8	<u>2,7</u>	nd	nd
4592	<u>16,9</u>	<u>4,6</u>	-2,0	1,9	<u>3,6</u>	0	0
5013	<u>51,3</u>	<u>7,4</u>	<u>7,8</u>	<u>3,0</u>	<u>8,7</u>	+++	+++

^a Par rapport à la souche PAO1. Les souches dont les allèles codant l'ARNr 23S ont été séquencés sont représentées en rouge. Les valeurs soulignées correspondent à une augmentation d'au moins deux fois des quantités de transcrits. + : faible retard de croissance, +++ : retard de croissance important, 0 : aucun retard de croissance.

5.2. Contribution de MexXY et OprM à la résistance de haut niveau aux aminosides chez les souches cliniques

Au sein de notre collection, la présence d'isolats plus fortement résistants aux aminosides mais ne produisant apparemment pas de mécanisme enzymatique inactivant les aminosides nous a incité à évaluer le rôle des protéines MexXY et OprM dans ce phénomène. Pour cela, 5 souches ont été sélectionnées pour leur résistance 2 à 4 fois supérieure à celle de mutants *agrZ* ou *agrW1* typiques. Parmi celles-ci, 3 étaient de type *agrZ* (2646, 4891 et 4194) et 2 de type *agrW1* (3452 et 3311). A noter que les souches 2646 et 3311, qui n'apparaissent pas dans les **Tableaux S1** et **4** de l'**Article 2**, sont génétiquement apparentées aux isolats 4891 et 3564, respectivement.

Afin de mieux comprendre la contribution respective de MexXY et OprM dans la forte résistance observée, nous avons retiré séparément les gènes *mexXY* et *oprM* chez les 5 souches cliniques sélectionnées et déterminé la CMI de plusieurs antibiotiques, substrats du système, chez les différents mutants obtenus. L'analyse des résultats a montré que la pompe MexXY/OprM, lorsqu'elle est surproduite, conférait aux bactéries d'origine clinique une résistance aux aminosides 8 à 32 fois supérieure à celle des mutants d'inactivation, alors que la différence chez PAO1 était de 8 fois (données concernant l'amikacine **Figure 27**). Les niveaux de résistance des mutants $\Delta oprM$ étant comparables à ceux des mutants $\Delta mexXY$, on peut en conclure que les protéines MexXY utilisent préférentiellement la protéine de

membrane externe OprM pour l'export des aminosides, chez les souches cliniques comme chez PAO1.

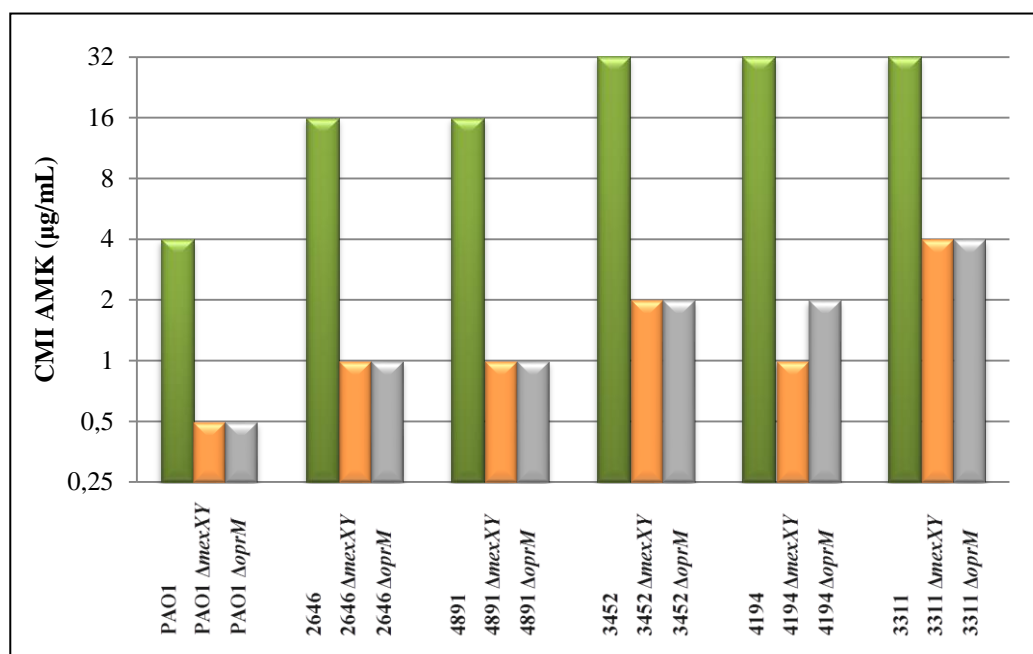


Figure 27. Résistance à l'amikacine (AMK) des souches sélectionnées et de leurs mutants Δ mexXY et Δ oprM.

Toutefois, l'existence de mécanismes additionnels chez les souches cliniques est suggérée par le fait que la résistance résiduelle est 2 à 8 fois plus élevée chez leurs mutants Δ mexXY que chez la souche PAO1. Nous avons testé l'hypothèse d'un défaut de pénétration des aminosides à travers la membrane externe à l'aide d'une sonde fluorescente, le NPN (*1-N-Phenyl-Naphthylamine*). De par leur caractère polycationique, les aminosides déplacent les ions Mg^{2+} qui assurent le « pontage » des molécules de LPS entre-elles *via* leurs groupements phosphate. En perturbant l'intégrité membranaire, ils seraient alors capables d'auto-amorcer leur pénétration dans la bactérie par un mécanisme de « *self-promoted uptake* » (Hancock, 1981).

Malgré plusieurs essais, aucune différence significative dans l'activité de perméabilisation des aminosides (gentamicine) n'a été observée entre la souche sauvage PAO1 et les isolats cliniques 2646, 3311, 3452 et 4891. D'une manière inattendue, la souche 4194 est même apparue, quant à elle, environ 10 fois plus perméable que PAO1 à la sonde en présence de gentamicine (**Figure 28**). Les mécanismes non enzymatiques dont les effets s'associent à ceux de l'efflux pour permettre à *P. aeruginosa* d'atteindre des niveaux de résistance plus élevés aux aminosides restent donc à identifier. Cependant, des résultats

préliminaires obtenus au laboratoire indiquent que certaines souches sont déficientes dans le transport actif de ces molécules à travers la membrane cytoplasmique.

A noter qu'aucun gène *oprM*-like à la fin de l'opéron *mexXY*, comme c'est le cas chez la souche multi-résistante PA7 (gène dénommé *oprA*), n'a été détecté chez ces souches.

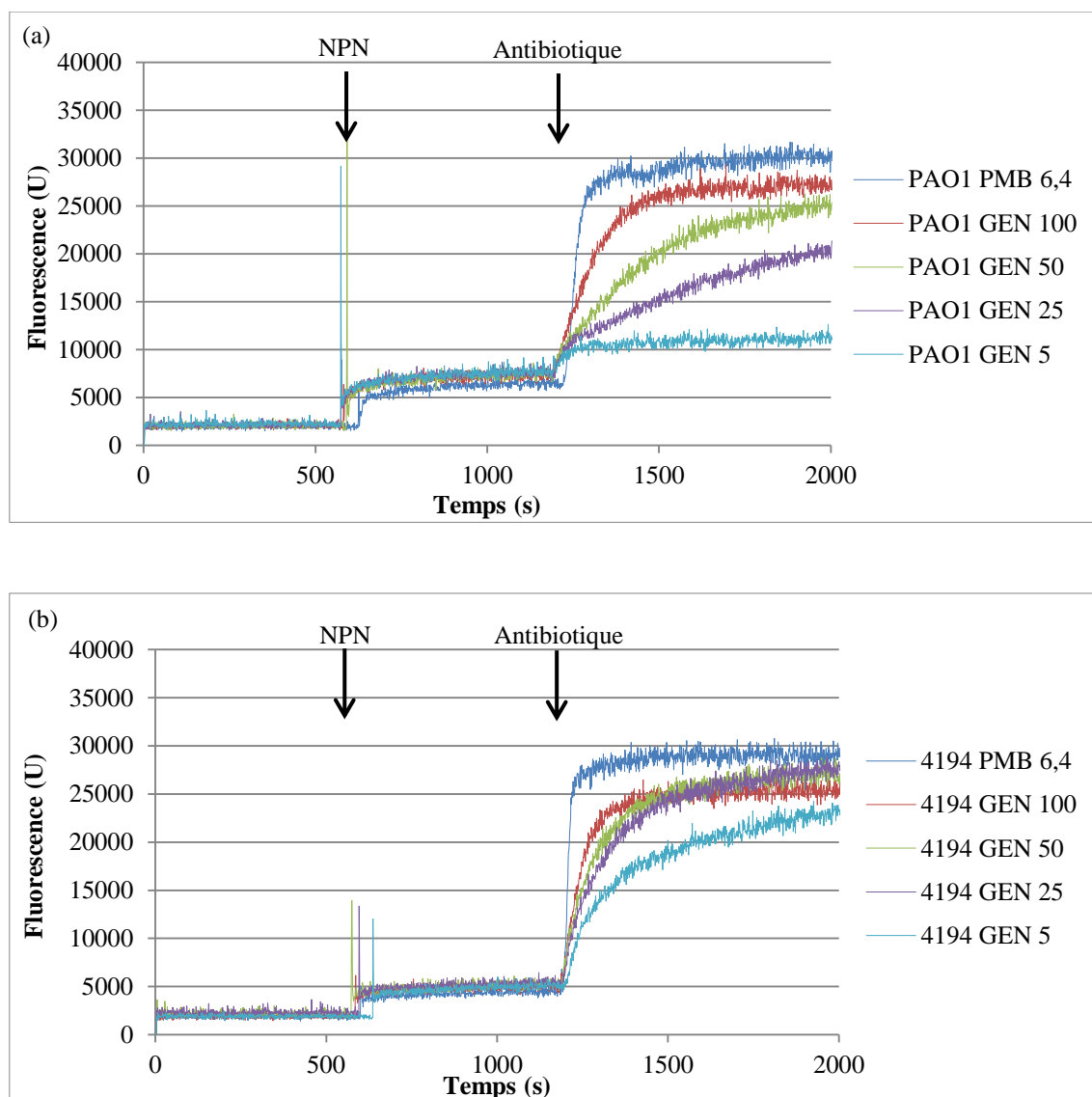


Figure 28. Courbes représentatives de l'activité perméabilisante de la gentamicine (GEN) sur la membrane externe des souches PAO1 (a) et 4194 (b).

La polymyxine (PMB) à 6,4 µg/mL a été utilisée comme agent de référence.

C. Autres travaux

Perte de l'efflux de type MexAB-OprM: un élément-clé de l'adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose

Article en cours de rédaction

1. Contexte de l'étude

Entre 1998 et 2007, 46 patients CF colonisés de façon intermittente ($n=15$) ou chronique ($n=31$) par *P. aeruginosa* ont été régulièrement suivis par le laboratoire de Bactériologie du CHU de Besançon. L'analyse de 189 isolats, collectés durant cette période, a révélé que 54,35% (25/46) des patients étaient colonisés par des souches beaucoup plus sensibles à la ticarcilline ($\text{CMI} \leq 4 \text{ mg/L}$; $n=53/189$) que la souche de référence PAO1 ($\text{CMI} = 32 \text{ mg/L}$) (Vettoretti *et al.*, 2009). Parallèlement, ces bactéries hypersensibles, nommées TicHS, présentaient des niveaux de résistance variables à la tobramycine, un aminoside utilisé fréquemment dans le traitement des patients CF.

Afin de mieux comprendre ce phénotype particulier, spécifique de la mucoviscidose, nous avons sélectionné 10 souches provenant de patients différents. La réalisation d'antibiogrammes standards a confirmé qu'elles étaient hypersensibles à la ticarcilline ainsi qu'à d'autres β -lactamines telles que l'aztréonam et la piperacilline (**Figure 29**).

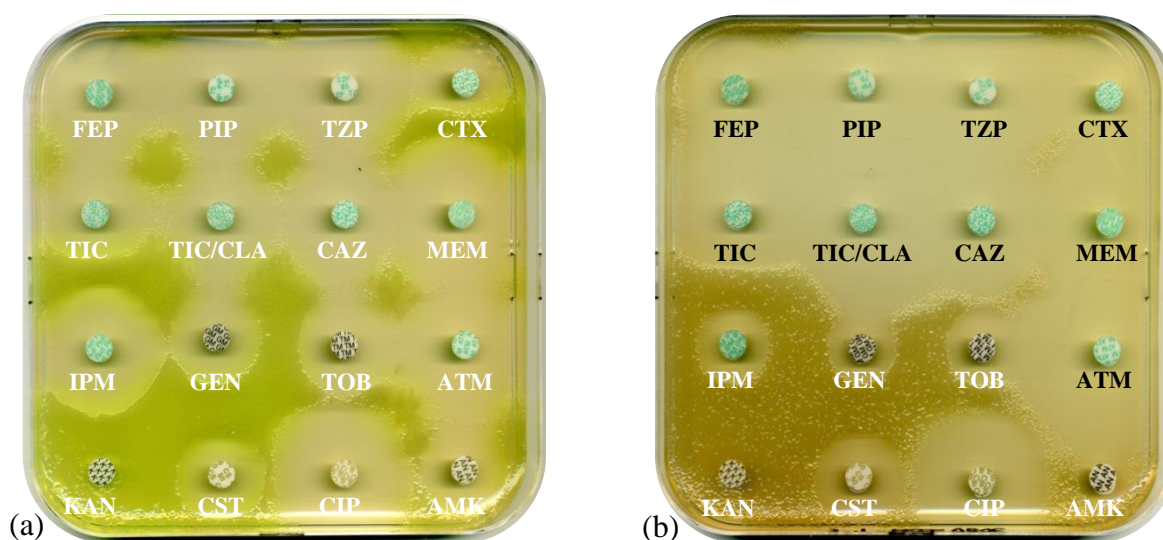


Figure 29. Antibiotogrammes de la souche de référence PAO1 (a) et d'une souche clinique de phénotype TicHS (b).

En noir sont représentées les β -lactamines pour lesquelles une diminution de la résistance a systématiquement été observée chez les souches TicHS.

Leur génotypage par amplification aléatoire de l'ADN génomique (RAPD) a révélé que les bactéries étaient non clonales (thèse Lucie Vettoretti). Dans cette étude ont été également inclus deux couples de souches, génétiquement identiques provenant du même malade l'une affichant un phénotype TicHS et l'autre une sensibilité sauvage à la ticarcilline. Chez un patient, l'isolat TicHS (3020R) était présent dans le même prélèvement que son parent

isogénique (3020S) ; alors que chez un autre, l'isolat sauvage (3525) s'est maintenu une année avant d'évoluer vers un phénotype TicHS (3807). L'isogénie au sein des couples a été confirmée par la comparaison des profils d'électrophorèse en champ pulsé de l'ADN total digéré par l'endonuclease *DraI* (**Figure 30**). Des travaux préliminaires réalisés au laboratoire ont montré que l'hypersensibilité des isolats CF ne résultait pas d'un défaut d'expression de la β -lactamase AmpC. Cette observation nous a amenée à suspecter un dysfonctionnement du système d'efflux MexAB-OprM.

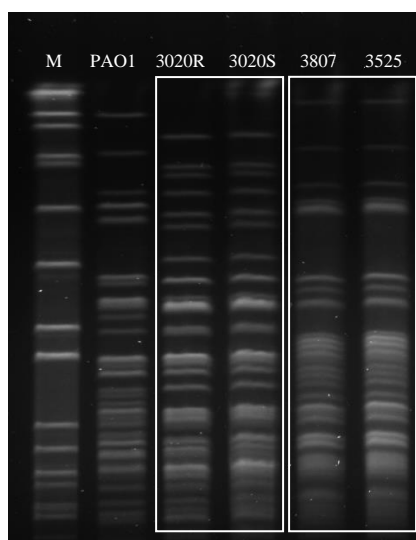


Figure 30. Profils électrophorétiques de l'ADN génomique des couples isogéniques 3020R/3020S et 3525/3807 après restriction par *DraI*.

Ce typage a été réalisé par le laboratoire d'Hygiène Hospitalière (Pascal Cholley, CHU Jean Minjoz). M : Marqueur de taille NCTC 8325.

2. Résultats

2.1. Caractérisation des souches sélectionnées

Le séquençage de l'ensemble des gènes *mexA*, *mexB* et *oprM* a été entrepris chez les 10 souches TicHS sélectionnées ainsi que chez les deux couples de souches isogéniques. Ces résultats ont été comparés aux 2 souches sauvages de référence, PAO1 et PA14.

Les 12 souches TicHS étudiées ont toutes présenté des mutations dans le gène *mexA* (8/12) ou le gène *mexB* (4/12), conduisant à des ruptures du cadre de lecture (6/12), à l'apparition de codons stop prématurés (2/12) ou encore à des substitutions d'acides aminés dans les protéines correspondantes (4/12) (**Tableau 19**).

Tableau 19. Tableau récapitulatif des mutations retrouvées dans les gènes *mexA* et *mexB* chez les souches TicHS sélectionnées.

Souches	Altérations			
	<i>mexA</i>	MexA	<i>mexB</i>	MexB
615	C ₇₅₂ T	S ₂₅₁ F		
3020R	Δ112 nt (370/482)	aberrante		
2715	A ₅₉₀ G	Y ₁₉₇ C		
2716			A ₇₇₆ T	Q ₂₅₉ L
2721	Δ1 nt (860)	aberrante		
2729	Δ8 nt (576/583)	aberrante		
2804			Δ1 nt (2147)	Aberrante
2858			Δ1 nt (494)	Aberrante
2933	Δ1 nt (870)	aberrante		
2998	C ₂₀₅ T	Q ₆₉ stop		
3066			G ₂₃₆₄ A	W ₇₈₈ stop
3807	G ₂₁₄ A	G ₇₂ S		

Parmi les 4 substitutions observées, seule G₇₂S avait été rapportée comme capable d'altérer la fonctionnalité de la pompe en compromettant l'oligomérisation de la protéine MexA (Nehme *et al.*, 2004). Dans cette même étude, la substitution S₂₅₁P avait été considérée comme non significative. Toutefois, l'analyse que nous avons réalisée grâce au logiciel SNAP, a suggéré que contrairement à la substitution S₂₅₁P, S₂₅₁F serait délétère (<https://www.rostlab.org/services/snap/>) (Bromberg and Rost, 2007). Les positions Q₂₅₉ (MexB) et en particulier Y₁₉₇ (MexA) étant très conservées chez les protéines homologues respectives (**Figure 31**), il est probable que les changements observés Y₁₉₇C et Q₂₅₉L conduisent également à l'inactivation de MexAB-OprM et au phénotype TicHS.

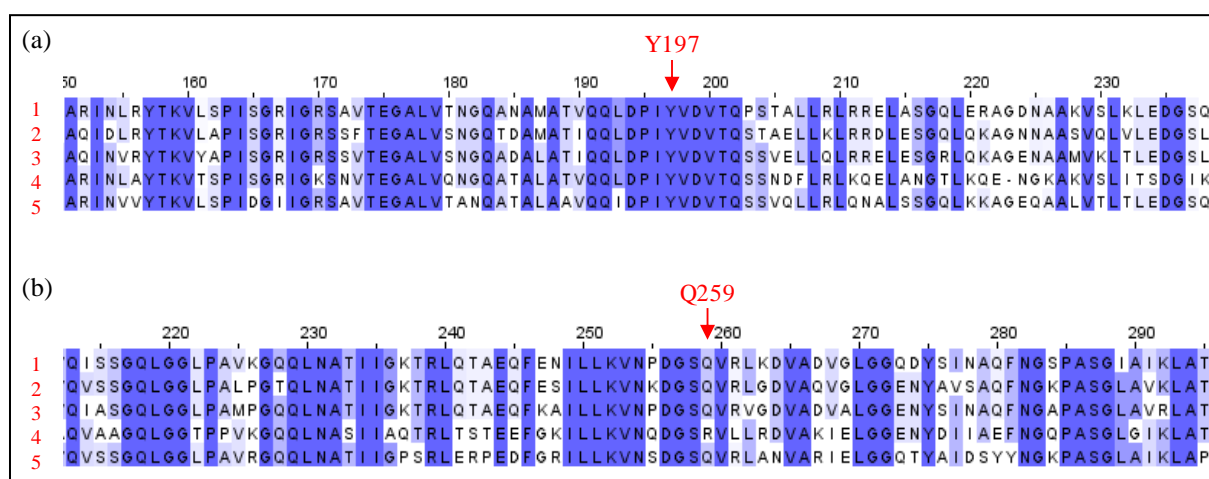


Figure 31. Alignements de MexA (1a) et MexB (1b) avec leurs homologues d'autres espèces. (2) TtgA/TtgB (*Pseudomonas putida*), (3) EmhA/EmhB (*Pseudomonas fluorescens*), (4) AcrA/AcrB (*E. coli*) et (5) AxyA/AxyB (*A. xylosoxydans*).

La localisation des ces mutations sur les structures 3D des protéines montre que les acides aminés substitués dans MexA se situent à l'interface des différents domaines de la protéine et pourraient agir sur la flexibilité de celle-ci et entraver sa capacité à s'associer avec ses partenaires (**Figure 32a**). La mutation localisée dans MexB, compte tenu de sa localisation à l'extrémité périplasmique de la protéine, pourrait perturber son assemblage avec MexA ou OprM (**Figure 32b**).

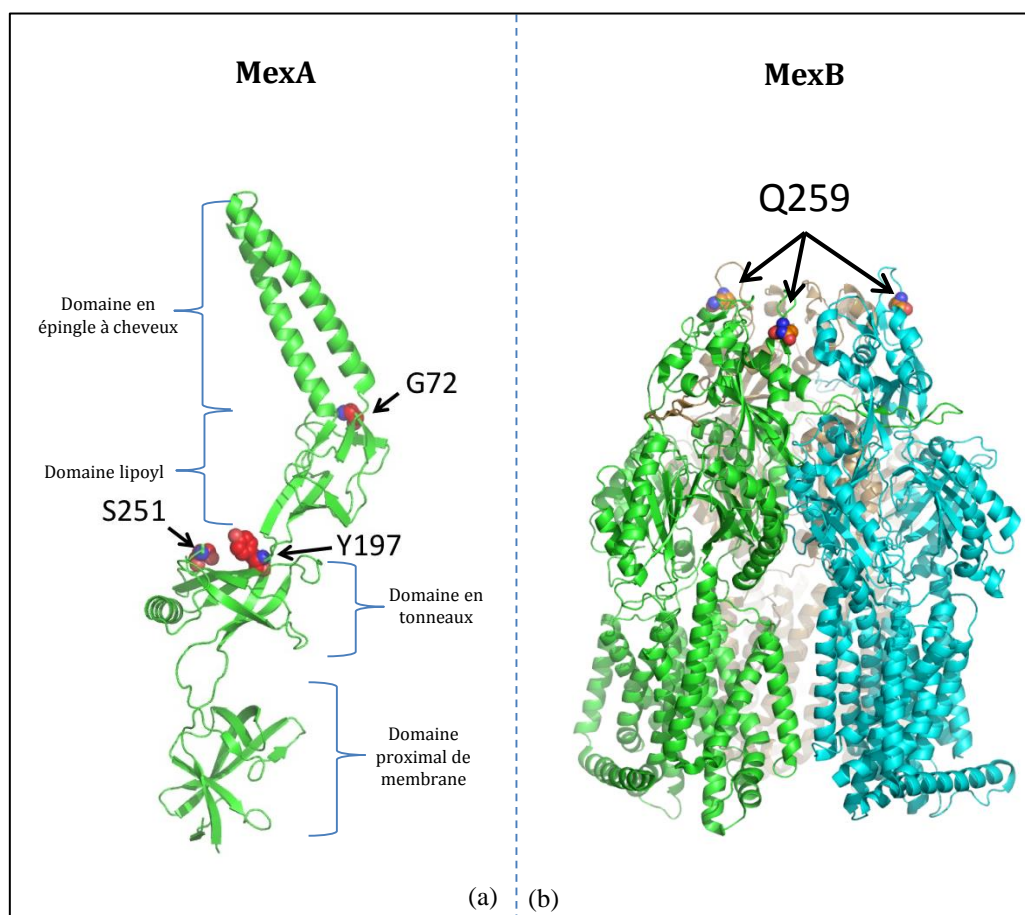


Figure 32. Localisation des mutations identifiées chez les souches cliniques sur les structures 3D des protéines MexA (monomère) (a) et MexB (trimère) (b).

2.2. Prévalence des souches déficientes dans le système MexAB-OprM

Afin de mieux évaluer la prévalence des mutants TicHS dans la mucoviscidose, nous avons entrepris le criblage d'une plus large collection de souches de *P. aeruginosa* ($n = 275$) issues de patients ($n=36$) suivis au CRCM (Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose) de Besançon. Cinq à 9 isolats séquentiels ont été sélectionnés au hasard chez chaque patient en incluant, lorsque cela était possible, la souche de primo-colonisation. Ces isolats étaient répartis dans le temps depuis le début de la collection du laboratoire (1995)

jusqu'à nos jours. Nous avons mesuré systématiquement le niveau de sensibilité (CMI) de ces isolats à la ticarcilline et à la novobiocine, deux substrats spécifiques de MexAB-OprM (Kohler *et al.*, 1996) (Li *et al.*, 1995). Dans un premier temps, afin de déterminer la valeur seuil de CMI de la ticarcilline en-dessous de laquelle une souche peut être considérée comme TicHS, nous avons mesuré la sensibilité de mutants *mexB::FRT* construits au laboratoire ainsi que des souches TicHS préalablement caractérisées. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 20**. Une CMI $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ a été retenue pour définir le phénotype TicHS. Les niveaux de résistance à la novobiocine variant entre 16 et 128 $\mu\text{g/mL}$ chez les souches MexAB-OprM déficientes, la valeur seuil pour cet antibiotique a été considérée comme étant de 128 $\mu\text{g/mL}$.

Comme attendu, le graphique représentant la répartition des souches TicHS ($n=101$) en fonction de la CMI de la novobiocine a révélé une distribution unimodale de la population centrée autour de la concentration 64 $\mu\text{g/mL}$ (**Figure 33a**). Les 4 souches pour lesquelles la CMI de la novobiocine était de 256 $\mu\text{g/mL}$ se sont montrées hypersensibles au sulfaméthoxazole (CMI $\leq 2 \mu\text{g/mL}$) ainsi qu'à l'aztréonam (CMI $\leq 1 \mu\text{g/mL}$), deux substrats efficacement transportés par la pompe MexAB-OprM. La souche la plus résistante à la novobiocine (CMI = 512 $\mu\text{g/mL}$) est apparue de sensibilité sauvage au sulfaméthoxazole (CMI $\geq 512 \mu\text{g/mL}$) et à l'aztréonam (CMI = 2 $\mu\text{g/mL}$), ce qui ne permet pas de conclure sur la fonctionnalité de MexAB-OprM, dont l'opéron devra être séquencé à la recherche de mutations.

La distribution des souches considérées comme non TicHS (CMI TIC > 4 $\mu\text{g/mL}$) ($n=174$) s'est avérée, quant à elle, bimodale avec un pic à 512 $\mu\text{g/mL}$ et un autre à 64 $\mu\text{g/mL}$. Aucun mécanisme, à notre connaissance, ne pouvant expliquer l'hypersensibilité à la novobiocine hormis la perte de fonctionnalité du système MexAB-OprM, nous avons envisagé l'existence de souches déficientes dans ce système mais dont le niveau de résistance à la ticarcilline (> 4 $\mu\text{g/mL}$), serait dû à la surproduction de la céphalosporinase naturelle AmpC.

Afin d'évaluer plus précisément la proportion des souches MexAB-OprM déficientes, dont le phénotype TicHS est masqué par la surproduction de la β -lactamase, nous avons déterminé la CMI de la ticarcilline en présence de cloxacilline 500 $\mu\text{g/mL}$, un inhibiteur de l'enzyme AmpC ; 36/174 isolats sont alors devenus hypersensibles à la ticarcilline (CMI $\leq 4 \mu\text{g/mL}$) en présence de cloxacilline, dont 34 hypersensibles à la novobiocine (CMI $\leq 64 \mu\text{g/mL}$). Les deux souches restantes se sont montrées de sensibilité diminuée à la novobiocine (CMI = 128 et 256 $\mu\text{g/mL}$, respectivement) mais hypersensibles au

sulfaméthoxazole (CMI = 2 et 8 µg/mL, respectivement), confirmant la déficience du système d'efflux MexAB-OprM.

L'utilisation de la nitrocéfine, une céphalosporine chromogène, en présence ou non de cloxacilline a confirmé la dérégulation de la β -lactamase AmpC chez les 36 souches au phénotype TicHS masqué (travail de Caroline BRECHET).

L'analyse de 7 isolats supplémentaires hypersensibles à la novobiocine (CMI \leq 128 µg/mL) mais dont le niveau de résistance à la ticarcilline n'était que partiellement abaissé en présence de cloxacilline 500 µg/mL (CMI $>$ 4 µg/mL) a démontré que tous étaient hypersensibles au sulfaméthoxazole (CMI \leq 16 µg/mL) et surproduisaient la céphalosporinase AmpC par le test à la nitrocéfine. La **Figure 33b** représente la distribution des 43 souches (36+7) dont le phénotype TicHS est masqué par l'enzyme AmpC, en fonction de la CMI de la novobiocine.

Tableau 20. Profils de résistance de mutants *mexB::FRT* et de souches cliniques TicHS présentant des mutations dans les gènes *mexA* ou *mexB*.

Souches	CMI (µg/mL)			
	CAZ	TIC	NOV	SMX
PAO1	2	32	512	>512
PAO1 <i>mexB::FRT</i>	1	1	32	8
PA14	1	16	256	>512
PA14 <i>mexB::FRT</i>	1	$\leq 0,5$	16	4
1401	1	16	512	>512
1401 <i>mexB::FRT</i>	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	64	8
61	1	16	512	>512
61 <i>mexB::FRT</i>	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	32	6
3020S ^a	2	16	512	>512
3020R ^a	2	2	128	8
3525 ^b	2	32	512	>512
3807 ^b	$\leq 0,5$	4	128	32
615	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	64	12
2715	1	1	32	16
2716	1	$\leq 0,5$	64	32
2721	1	$\leq 0,5$	32	1
2729	1	2	64	16
2804	1	2	16	4
2858	1	$\leq 0,5$	32	8
2933	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	64	4
2998	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	64	4
3066	8	$\leq 0,5$	64	8

^{a,b} Couples de mutants isogéniques.

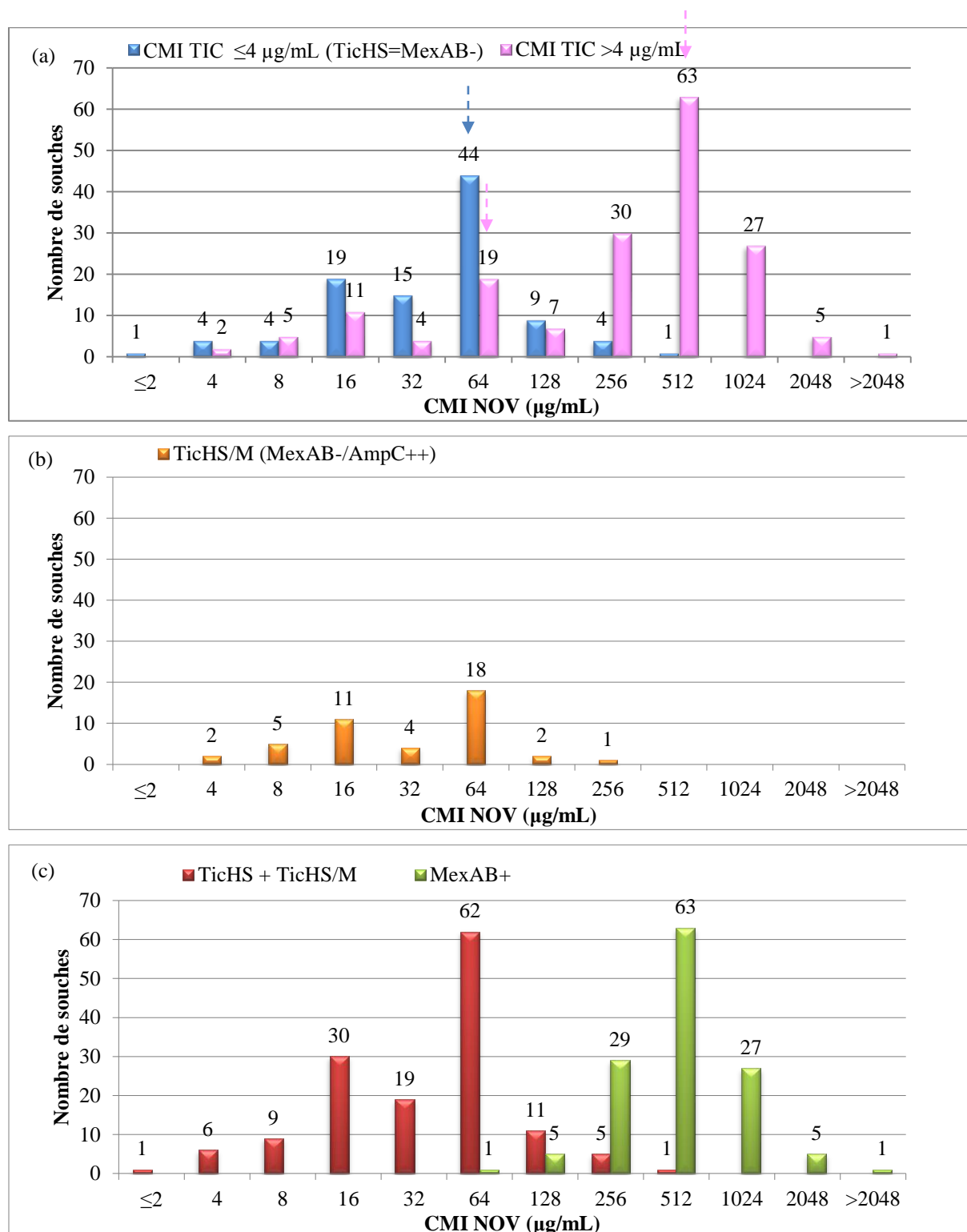


Figure 33. Distribution des souches déficientes ou non dans le système MexAB-OprM en fonction de la CMI de la novobiocine.

MexAB- : déficience du système MexAB-OprM. MexAB+ : système MexB-OprM fonctionnel. TicHS/M : déficience du système MexAB-OprM et surproduction de la β -lactamase AmpC (AmpC++). (a) TicHS ($n=101$). (b) TicHS/M ($n=43$). (c) TicHS + TicHS/M ($n=144$).

Ainsi, parmi notre collection, nous avons identifié 53% (144/275) d'isolats déficients dans le système MexAB-OprM, répartis en 101 souches TicHS (37%) et 43 souches au phénotype TicHS masqué (16%) (**Figure 33c**). Cette étude démontre que la perte de fonction du système est plus fréquente que rapportée précédemment par notre équipe (28%) (Vettoretti *et al.*, 2009), et souligne d'autant l'importance du phénomène dans la mucoviscidose.

2.3. Distribution du phénotype TicHS intra-patients

Les résultats, représentés **Figure 34**, indiquent que 88,9% (32/36) des patients sont colonisés, au moins temporairement, par des souches MexAB-OprM déficientes surproduisant ou non la β -lactamase AmpC comme mécanisme de protection contre les traitements IV (IntraVeineux) par β -lactamine (ceftazidime surtout). Chez 16 patients porteurs de souches TicHS aucun isolat surproduisant AmpC n'a été retrouvé. Néanmoins, ces résultats n'excluent pas totalement la présence de telles souches chez ces patients puisque la totalité des isolats n'a pas été étudiée.

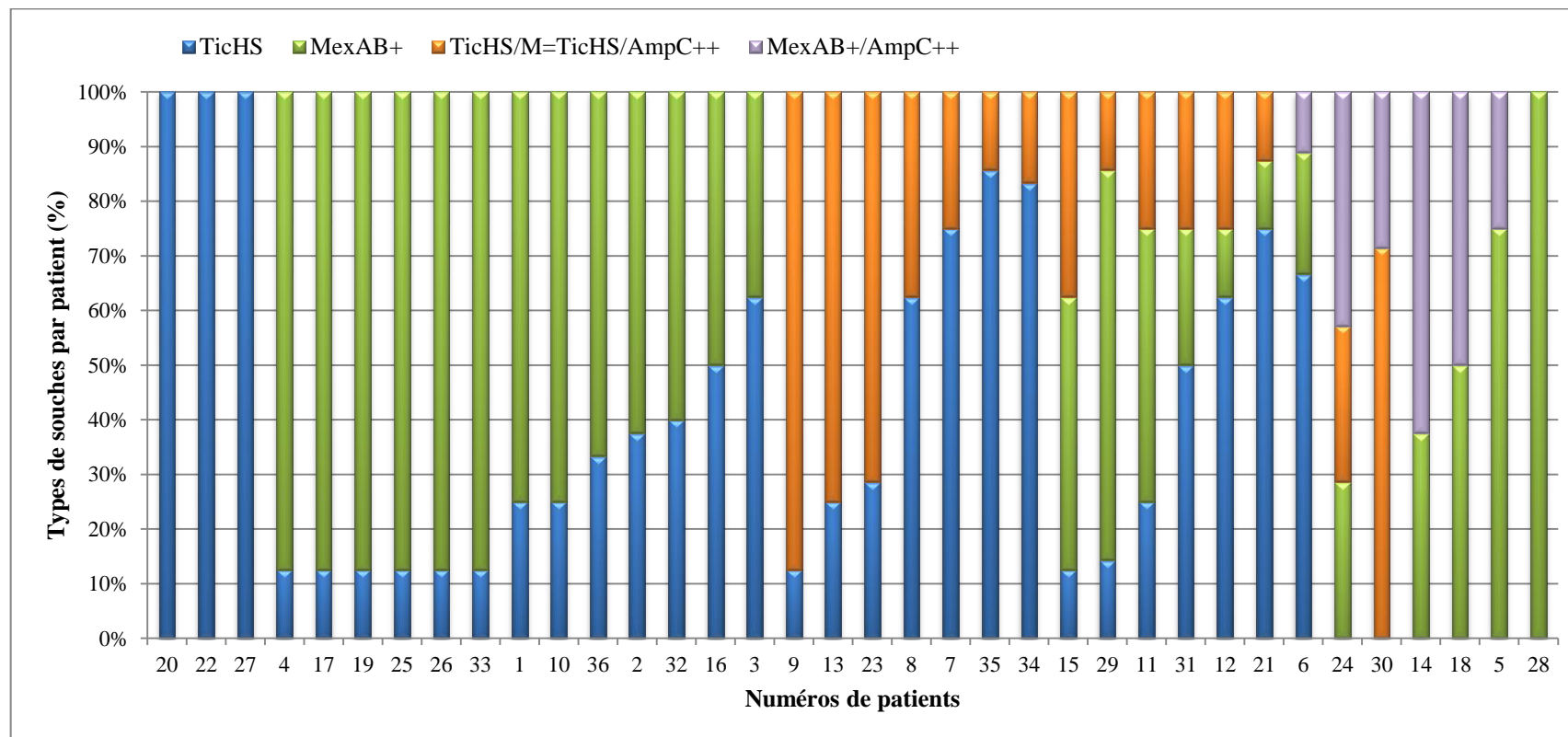


Figure 34. Distribution des phénotypes TicHS, TicHS/M, MexAB+ et MexAB+/AmpC++ parmi les 36 patients analysés.

2.4. Distribution des souches en fonction de l'âge des patients

Dans cette dernière partie, nous avons étudié la distribution des isolats en fonction de l'âge des patients. Comme l'indique la **Figure 35**, l'altération de la pompe apparaît précocement au cours de la colonisation. La proportion de souches surproduisant la β -lactamase AmpC (AmpC++) augmente ensuite progressivement, aussi bien dans la population MexAB- que MexAB+, ceci probablement sous la pression de sélection des traitements antibiotiques administrés aux malades. Chez les patients adultes (>25 ans) les sous-populations de mutants AmpC++ sont fréquentes (33/67 isolats) mais des isolats présentant un phénotype TicHS continuent d'être isolés des expectorations. La question se pose de savoir si la perte du système MexAB-OprM constitue pour *P. aeruginosa* un avantage adaptatif dans l'environnement pulmonaire CF ou un événement neutre, la bactérie se débarrassant de toutes ses fonctions inutiles sous l'effet de mutations. Ainsi, nous avons examiné la production de plusieurs facteurs de virulence chez les bactéries MexAB-.

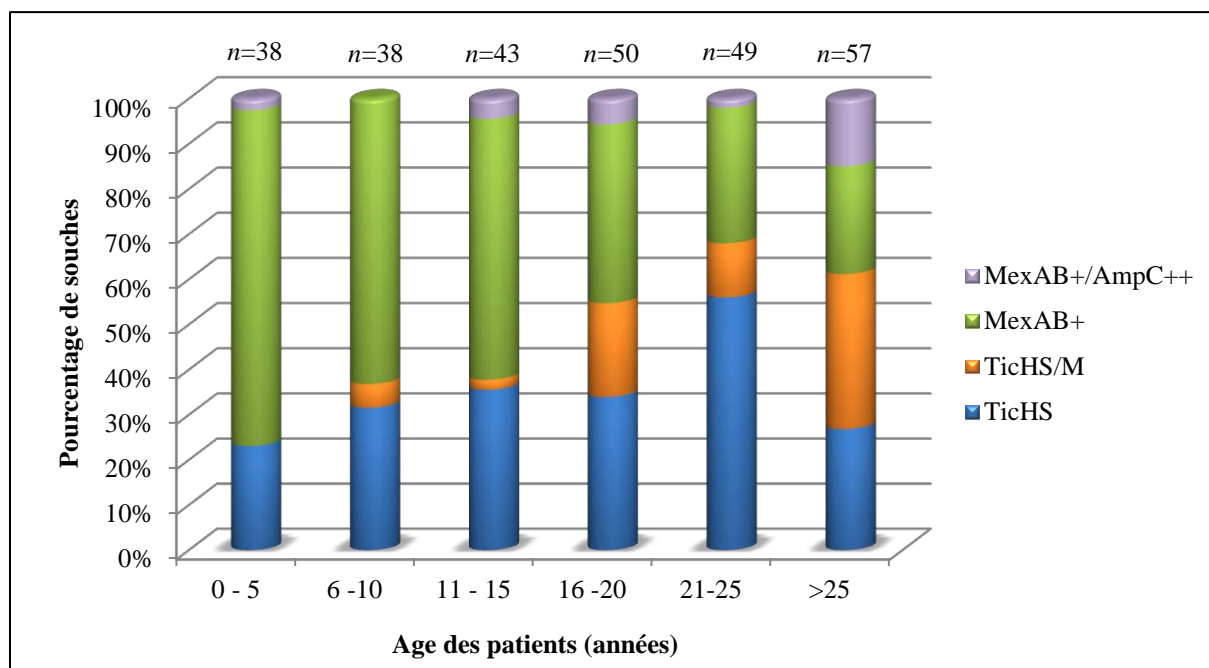


Figure 35. Distribution en pourcentage des phénotypes TicHS, TicHS/M et MexAB+ en fonction de l'âge des patients.

Les chiffres au dessus du graphique représentent le nombre de souches analysées par tranche d'âge.

2.5. Etude de la virulence

Plusieurs publications suggèrent que le système MexAB-OprM à la capacité de transporter des molécules non antibiotiques, notamment une acyl-homosérine lactone en C12

(C12-HSL) sécrétée par *P. aeruginosa*, intervenant dans le quorum sensing et dont la concentration varie en fonction de la densité cellulaire (Evans *et al.*, 1998) (Pearson *et al.*, 1999). En fin de phase exponentielle de croissance, la concentration extracellulaire en C12-HSL augmente fortement favorisant en retour la diffusion intracellulaire de la molécule signal. Lorsqu'une valeur seuil est atteinte, de nombreux gènes de virulence sont activés *via* le système LasI-LasR. Ainsi, en s'opposant à l'accumulation intracellulaire de C12-HSL, le système MexAB-OprM pourrait retarder la production de facteurs de virulence dépendant du quorum sensing. Dans une étude, Evans *et al.* ont montré en effet que la surproduction constitutive de MexAB-OprM était associée à une plus faible synthèse d'élastase (Evans *et al.*, 1998). Parallèlement, des mutants surexprimant MexAB-OprM étaient moins aptes que les souches sauvages à envahir une monocouche de cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) et à entraîner la mort de souris infectées (Hirakata *et al.*, 2002).

Compte tenu de ces observations, nous avons cherché à savoir si la perte du système MexAB-OprM pouvait, quant à elle, conduire à une virulence augmentée notamment chez les patients CF.

2.5.1. Résultats en "endpoint" après 24 ou 48 heures d'incubation

L'analyse qualitative, quantitative ou semi-quantitative des facteurs de virulence produits par les bactéries TicHS a été effectuée après ensemencement de milieux spécifiques suivi d'une incubation de 24h ou 48h.

Ce travail a été réalisé sur 12 souches cliniques TicHS caractérisées (**Tableau 19**), sur 2 couples CF isogéniques (sauvage/TicHS) ainsi que sur un mutant PAO1 *mexB::FRT*. Ont été également inclus 4 isolats CF clonaux collectés chez un même patient à différents stades de la colonisation : primo-colonisation (1401), milieu de colonisation (1622 et 2801) et fin de colonisation après un épisode de greffe (2890). La clonalité de ces isolats a été confirmée par MLVA (*Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*) (résultats non montrés). Les résultats obtenus pour les souches de phénotype TicHS ont été comparés à 2 isolats CF de phénotype sauvage (2293 et 3023) ainsi qu'aux souches sauvages de référence PAO1 et PA14.

Les résultats (pyocyanine, pyoverdine, protéases, rhamnolipides, phospholipase C, aptitude au swimming, au swarming et au twitching) sont rapportés dans le **Tableau 21**. Comme nous pouvons le constater, le mutant PAO1 *mexB::FRT*, déficient dans le système MexAB-OprM, présente globalement les mêmes caractéristiques de virulence que la souche

parentale sauvage PAO1. On notera seulement une baisse, peut-être non significative, de l'activité phospholipase C. L'altération de la protéine MexA chez 3020R a également peu d'effets sur la production ou l'activité des facteurs de virulence étudiés. Par comparaison avec la souche parentale 3020S, seule une diminution de la production de pyocyanine (2 fois) est observée chez la souche 3020R. La non-fonctionnalité du système MexAB-OprM chez la souche 3807 a, elle aussi, un impact modéré sur la virulence hormis une diminution de la production de pyocyanine associée à une activité phospholipase C accrue (souche parentale 3525). En fait, des variations qualitatives et quantitatives parfois importantes apparaissent d'un couple à l'autre, vis-à-vis des différents facteurs de virulence étudiés sans corrélation avec la perte de fonctionnalité du système MexAB-OprM. Comparées aux souches de référence PAO1 et PA14, ces différences se retrouvent chez les 10 souches TicHS isolées de patients différents, qui globalement présentent des déficits dans plusieurs facteurs de virulence. Il est à noter que la production de pyoverdine et le swimming semblent toutefois plutôt conservés chez ces isolats. Enfin, les souches 2293 et 3023, toutes deux de sensibilité sauvage aux antibiotiques, s'avèrent très différentes sur le plan de la virulence puisque l'une d'entre elles (3023) affiche un phénotype proche de celui de PA14 tandis que l'autre (2293) présente de nombreux déficits (pyocyanine, phospholipase C...).

Ainsi, ces résultats suggèrent qu'aucune caractéristique particulière n'est associée au phénotype TicHS. Par contre, le déficit en déterminants de virulence est un phénomène bien connu dans la mucoviscidose où l'on observe une perte progressive de ces facteurs au cours de la colonisation chronique qui signe l'adaptation des souches à leur environnement (Bjarnsholt *et al.*, 2010). Cette observation se confirme au regard de l'analyse d'isolats collectés séquentiellement chez un même patient, à savoir que la souche de primo-colonisation (1401) présente des caractéristiques proches de celles de PA14 alors que la souche tardive (2890) ne produit plus, en revanche que quelques facteurs de virulence. La diversification des souches dans le poumon CF au cours du temps ne nous permet donc pas de conclure sur une éventuelle co-évolution entre la production de facteurs de virulence dépendants ou non du quorum sensing et l'inactivation du système d'efflux MexAB-OprM.

Tableau 21. Etude de la production ou de l'activité de différents facteurs de virulence.

Souches	Pigments		Activité protéolytique		Hémolysines		Mobilité		
	Pyocyanine (%) ^a	Pyoverdine ^b	protéases totales ^c	Activité hémolytique ^d	Rhamnolipides ^e	Phospholipase C (%) ^f	Swimming ^g	Swarming ^h	Twitching ⁱ
Souches de référence									
PAO1	100	+	++	+	+	100	++	+	+/-
PAO1 <i>mexB::FRT</i>	93	+	++	+	+	65	++	+	+/-
PA14	118	+	++	+	+	51	++	+	++
Souches cliniques									
3020S	193	+	++	+	+	75	++	+	+
3020R	106	+	++	+	+	70	++	+	+
3525	172	+	-	-	-	39	+/-	+	+/-
3807	100	+	-	-	-	87	+	+	+/-
615	456	+	+	-	-	53	+/-	-	+/-
2715	<5	+	+	-	-	80	+	-	+/-
2716	<5	+	-	+	-	<5	++	-	+/-
2721	<5	-	+/-	-	-	<5	+	-	-
2729	175	+	++	+	+	45	++	+	+/-
2804	<5	+	-	-	-	<5	-	-	-
2858	137	+	++	-	-	12	++	+	+/-
2933	325	+	+	-	-	72	+	+	+/-
2998	81	+	+	+	-	51	+	-	-
3066	<5	+	+/-	-	-	19	+	-	-
1401	106	+	++	+	+	30	++	+	+
1622	118	+	++	+	+	43	++	+	+
2801	<5	-	+	+	nd	<5	++	-	-
2890	<5	-	+/-	-	nd	<5	+	-	-
2293	<5	+	+	+	-	24	-	+	+/-
3023	100	+	+	+	+	116	++	+	++

^a Production de pyocyanine rapportée à celle de la souche de référence PAO1. ^b Production de pyoverdine (+) ; absence de production (-). ^c Activité protéolytique, absence de zone d'éclaircissement autour du spot (-) ; 1-2 mm (+/-) ; 3-5 mm(+) ; >5 mm (++) . ^d Activité hémolytique (+), absence de zone d'éclaircissement (-). ^e Production de rhamnolipides, absence de halo (-). ^f Activité de la phospholipase C rapportée à celle de la souche de référence PAO1. ^g Absence de zone de swimming (-) ; <1 cm (+/-) ; 1-3 cm (+) ; >3 cm (++) . ^h Zone de swarming <1 cm (-) ; ≤1 cm (+). ⁱ Absence de zone de twitching (-) ; ≤0,5 cm (+/-) ; 0,5-3 cm (+) ; >3 cm avec forte coloration (++) . Les isolats déficients dans le système MexAB-OprM sont représentés en rouge.

2.5.2. Cinétique de production des rhamnolipides et de l'élastase

Les résultats précédents ayant été obtenus après 24 ou 48h d'incubation, nous avons envisagé que le déficit en MexAB-OprM puisse affecter, non pas la production finale, mais la cinétique de production de certains facteurs de virulence en permettant une accumulation intracellulaire plus précoce de C12-HSL, donc à des densités bactériennes plus faibles.

Nous avons focalisé notre attention sur l'élastase et les rhamnolipides, régulés respectivement par les systèmes Las et Rhl. Bien que les C12-HSL soient directement impliquées dans la régulation des facteurs de virulence dépendant du système Las, ce dernier influe également sur le système Rhl (Sifri, 2008).

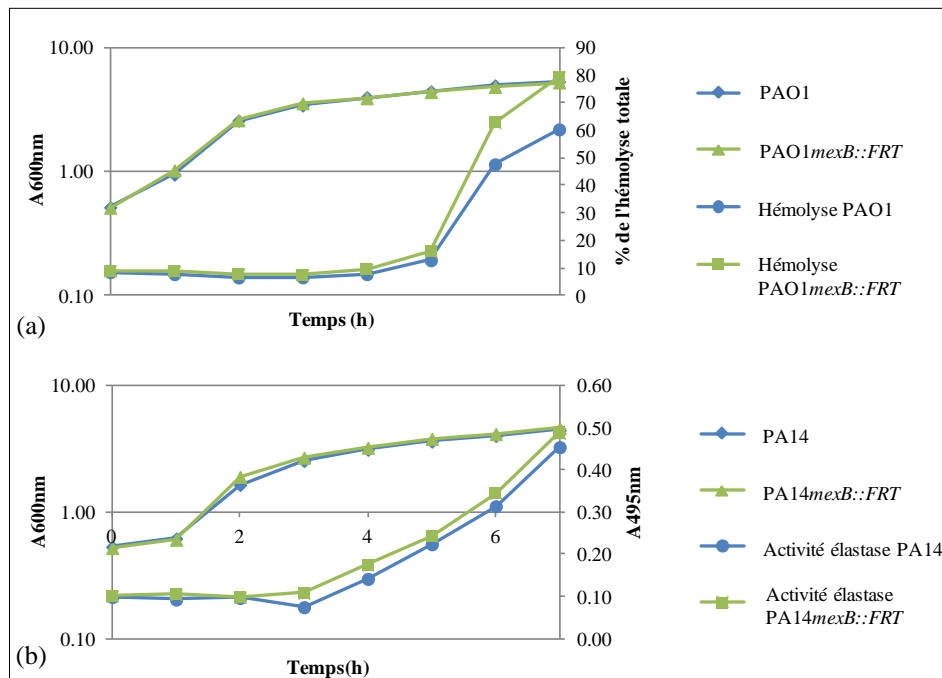


Figure 36. Cinétique de l'activité hémolytique thermostable pour le couple PAO1/PAO1mexB::FRT (a). Cinétique de production de l'élastase pour le couple PA14/PA14mexB::FRT.

Cette étude a été réalisée sur tous les isolats TicHS sélectionnés, sur les couples de bactéries isogéniques ainsi que sur le couple PAO1/PAO1 *mexB::FRT*. De plus, afin d'étudier l'impact de la perte de MexAB-OprM dans différents fonds génétiques, nous avons construit de nouveaux mutants déficients dans le système MexAB-OprM, notamment à partir de la souche de référence PA14, d'une souche CF (1401) et d'une souche clinique non CF (61). Aucune différence significative n'a été observée dans le déclenchement de la production de

rhamnolipides ou d'élastase pour aucun des couples étudiés confirmant les résultats de la méthode en point final. La **Figure 36** donne un exemple des résultats obtenus.

2.5.3. Etude de la cytotoxicité dépendante du système de sécrétion de type III

Afin d'expliquer la prévalence élevée des souches TicHS chez les patients CF, nous nous sommes intéressés à l'activité cytotoxique des bactéries liée au système de sécrétion de type III. Ce système est constitué d'une partie basale associée à une aiguille se projetant à la surface de la bactérie, et d'une extrémité capable de s'insérer dans la membrane plasmique des cellules cibles. Ce système permet à la bactérie d'injecter différentes toxines dont ExoS/U, ExoT et ExoY (Engel and Balachandran, 2009). Nous avons ainsi étudié la cytotoxicité de PAO1 et différents mutants (dont un surproduisant le système MexAB-OprM) sur une lignée cellulaire macrophagique, J774.1. La lyse des macrophages après 3h de contact a été évaluée en mesurant l'activité lactate déshydrogénase dans les surnageants de culture. La **Figure 37** est représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats qui demandent confirmation dans d'autres fonds génétiques semblent indiquer que le mutant PAO1 *mexB::FRT* est significativement plus cytotoxique que la souche sauvage PAO1 et le mutant surproduisant MexAB-OprM après 1,5 h d'infection. Un avantage en termes de cytotoxicité pourrait résulter de la "perte" du système MexAB-OprM. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe CNRS Biologie du Cancer et de l'Infection (CEA Grenoble, France) du Dr Ina Attrée.

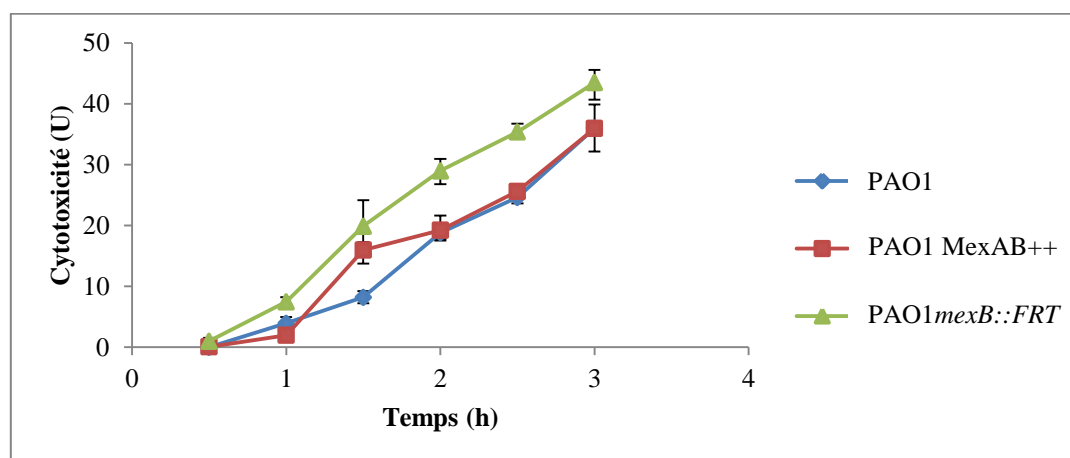


Figure 37. Cytotoxicité de la souche PAO1 et de son mutant dérivé surproduisant MexAB-OprM (MexAB++) et celui inactivé dans le système (PAO1*mexB::FRT*).

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la lyse totale des macrophages par le Triton X-100.

2.6. Etude du fitness

Une autre hypothèse pouvant expliquer la forte prévalence des souches TicHS dans le poumon CF serait leur éventuel avantage en termes de fitness sur les bactéries sauvages. Pour tenter de le démontrer, des expériences de compétition ont été menées avec les 3 couples isogéniques (PAO1/PAO1*mexB::FRT*, 3020R/3020S et 3525/3807) (**Figure 38**). Pour les deux premiers couples, le mutant TicHS s'est maintenu au même niveau de croissance que la souche sauvage, tandis que l'isolat TicHS (3807) a supplanté son parent sauvage (3525) en fin de phase exponentielle de croissance (t=8 h), indiquant ainsi que l'inactivation de MexAB-OprM n'a pas un effet univoque sur le fitness bactérien, au moins dans un milieu de culture standard.

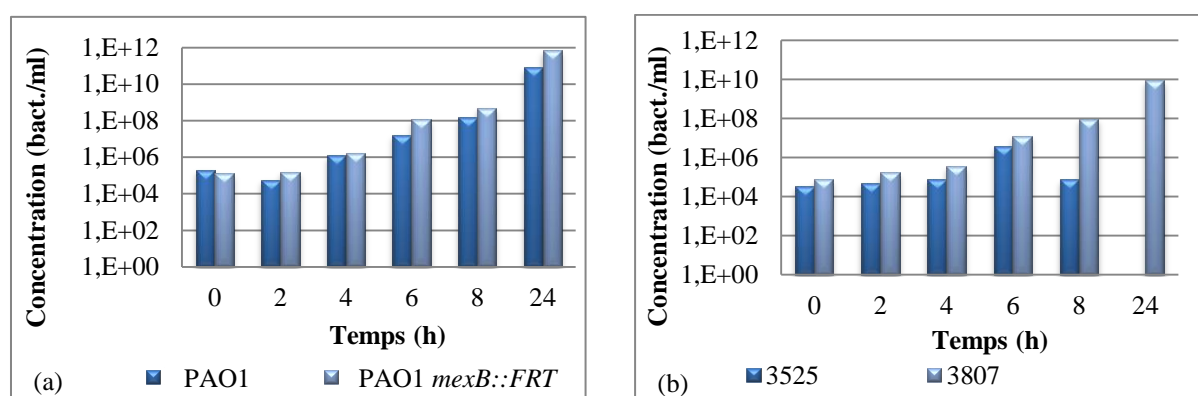


Figure 38. Dénombrement des populations WT et TicHS après 24 heures de co-culture pour les couples PAO1/PAO1*mexB::FRT* (a) et 3525/3807 (b)

CONCLUSION-PERSPECTIVES

La caractérisation des systèmes d'efflux actif chez *P. aeruginosa* repose essentiellement sur l'étude de mutants obtenus en laboratoire dérivant de souches dites « de référence ». Toutefois, tirer des conclusions générales d'observations ponctuelles peut s'avérer hasardeux. Par exemple, il est apparu récemment que plusieurs équipes travaillant sur les mécanismes de régulation de l'opéron d'efflux *mexEF-oprN* avaient pris pour modèle d'étude une souche renfermant une séquence de 8 nucléotides inactivant le gène codant le régulateur transcriptionnel MexT (Maseda *et al.*, 2000). Les repiquages en cascade de la souche initiale, PAO1, isolée dans les années 1950 par Bruce Holloway sont probablement à l'origine de la sélection occulte de mutants ayant perdu en partie des caractéristiques de l'espèce. Par ailleurs, la multiplication des analyses génomiques laisse entrevoir une diversité génétique jusque-là insoupçonnée chez *P. aeruginosa* qui remet en question la notion même de « souche de référence » unique. Aussi, la prudence est-elle recommandée, notamment lorsque certains résultats obtenus *in vitro* sont interprétés en termes thérapeutiques. La validation des données sur des souches cliniques s'avère une étape incontournable lorsque de nouveaux mécanismes de résistance ou de virulence sont décrits.

Notre travail de thèse a porté en premier lieu sur la caractérisation de souches cliniques de *P. aeruginosa* surproduisant le système d'efflux MexXY/OprM (MexXY++). Faisant suite à des études menées au laboratoire ayant conduit à l'identification de trois types différents de mutants (*agrZ*, *agrW1*, *agrW2*) chez la souche PAO1, nous avons montré que l'altération du gène *mexZ* est l'événement génétique majeur à l'origine de la surexpression de l'opéron *mexXY* chez les souches isolées de patients, ce que suggérait la littérature (Baum *et al.*, 2009) (Campo Esquisabel *et al.*, 2011) (Vogne *et al.*, 2004) (Islam *et al.*, 2004) (Llanes *et al.*, 2004) (Qin *et al.*, 2012) (Mulcahy *et al.*, 2010) (Feliziani *et al.*, 2010). Par ailleurs, nous avons pu démontrer pour la première fois l'existence de souches cliniques *agrW1* (14%) et *agrW2* (8,8%). Afin de comprendre les différences de prévalence entre ces mutants, il est nécessaire de revenir sur la nature et les conséquences des altérations génétiques observées.

La surexpression de l'opéron *mexXY* chez les mutants de type *agrZ* résulte de la synthèse d'un peptide MexZ non fonctionnel ne pouvant plus exercer son activité de répresseur vis-à-vis de l'opéron *mexXY*. Cet événement peut résulter de n'importe quelle altération du gène *mexZ* telle qu'une rupture du cadre de lecture (insertion, délétion de nucléotides, intégration d'une séquence d'insertion), l'apparition d'un codon stop prématuré, ou des substitutions de nucléotides associées à des changements d'acide aminé dans des domaines fonctionnels-clé du répresseur (liaison à l'ADN, zone de dimérisation) ou des éléments de structure conservés. Le caractère aspécifique de ces événements explique la

fréquence relativement élevée d'apparition des mutants *agrZ in vitro* sur milieu sélectif (Hocquet *et al.*, 2008) et leur prévalence en clinique.

Bien que diverses et pour certaines peu spécifiques, les mutations de type *agrW1* ne peuvent en revanche qu'entraîner des altérations mineures de la synthèse protéique sous peine d'être létales pour la bactérie. Les perturbations doivent toutefois être suffisantes pour déclencher l'activation du gène *PA5471* via le mécanisme d'atténuation de la transcription impliquant le peptide leader *PA5471.1*. La redondance des allèles codant pour les ARN ribosomaux explique probablement pourquoi deux mutants sélectionnés *in vitro* (PAOW1, KJD9) et deux souches cliniques (3136, 3564) de type *agrW1* présentaient des mutations dans l'un des allèles codant pour l'ARNr 23S. Les protéines ribosomales étant déterminées par des gènes uniques (hormis L7 et L12), on peut s'attendre à ce que leur inactivation soit létale pour la cellule bactérienne. Toutefois, des altérations mineures de structure (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999) ou d'expression (Lau *et al.*, 2012) peuvent être tolérées par la bactérie et provoquer la surexpression de l'opéron *mexXY*. Il en va de même de certaines protéines contribuant au fonctionnement du ribosome telles que Fmt (méthionyl-ARNt formyle transférase), FOLD (synthèse des folates et production du groupement formyle) (Caughlan *et al.*, 2009) ou L25 (El'Garch *et al.*, 2007) dont l'inactivation est compensée par des mécanismes de « *bypass* ». La recherche de mutations dans les gènes correspondants (*rplA*, *fmt*, *fold*, *rplY*) ou leurs régions promotrices (*rplU-rpmA*) s'est avérée négative chez les 5/8 souches cliniques de type *agrW1* non caractérisées (2/8 souches ayant des mutations dans l'ARN 23S et 1/8 un peptide leader tronqué). Ce résultat n'est pas surprenant en soi si l'on considère la diversité des protéines, ribosomales ou non, intervenant d'une façon ou d'une autre dans le processus de traduction et pouvant être potentiellement la cause de l'activation du gène *PA5471*. Afin de progresser dans ce domaine, nous projetons d'isoler d'autres mutants *agrW1 in vitro*, de déterminer par séquençage génomique quels gènes sont altérés et de vérifier secondairement si les mutations identifiées existent chez les souches cliniques.

Chez les bactéries de type *agrW2*, le système à deux composants ParRS est activé de façon permanente par des mutations introduisant des changements d'acide aminé dans la séquence du senseur ParS ou du régulateur de réponse ParR. Bien que diverses, ces mutations ont une certaine spécificité en ceci qu'elles affectent des domaines précis de l'un ou l'autre des partenaires protéiques (**Figure 39**).

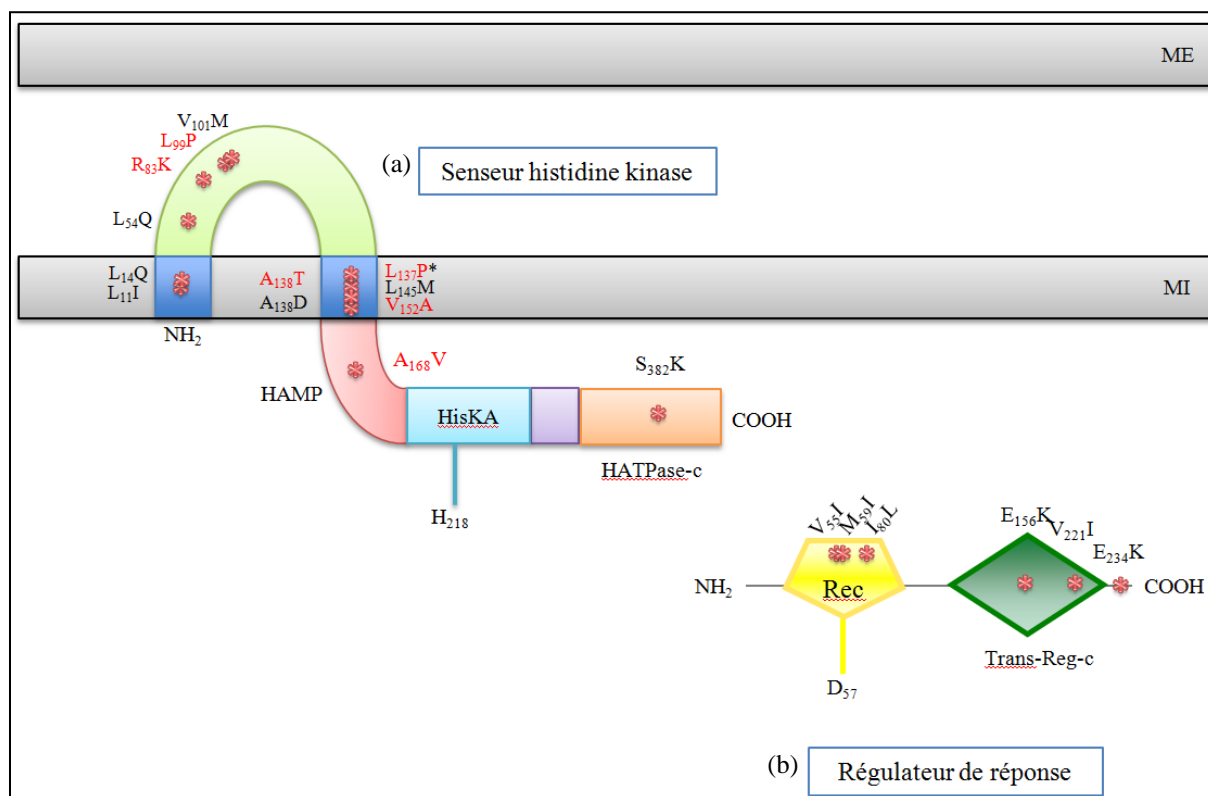


Figure 39. Localisation des mutations identifiées chez les mutants *agrW2* sur une représentation schématique du système à deux composants ParRS.

Les mutations identifiées dans ce travail sont représentées en rouge. En noir sont indiquées celles identifiées par Muller *et al* et Fournier *et al*. (Muller *et al.*, 2011) (Fournier *et al.*, 2006). *Mutation identifiée à la fois dans cette étude et dans les travaux de Muller *et al.*. Le senseur histidine kinase (HK) ParS (a) se compose d'un domaine senseur comprenant une boucle périplasmique (représentée en vert clair) et deux segments transmembranaires (bleu foncé) ainsi que d'un domaine transmetteur constitué du domaine HisKA (*Histidine Kinase A*) (vert clair) contenant un résidu histidine très conservé nécessaire à la réaction de phosphorylation et un domaine HATPase-c (*Histidine kinase-type ATPase catalytic*) (orange) ; l'ensemble permettant la fixation d'une molécule d'ATP et le transfert d'un groupement phosphate sur le résidu histidine. Le domaine HAMP (*Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl binding proteins, Phosphatases*) (rouge), quant à lui, fait le lien entre le domaine senseur et le domaine transmetteur. Le régulateur de réponse ParR se compose de deux domaines, un domaine receveur (REC) (jaune) et un second interagissant avec l'ADN (Trans-Reg-c : *Transcriptional Regulatory c-terminal*) (vert foncé). L'activation du système se traduit par l'autophosphorylation de la protéine senseur. Cette réaction couple l'hydrolyse d'une molécule d'ATP à la fixation d'un groupement phosphate, de très haute valeur énergétique, sur le résidu histidine. L'HK phosphorylée transfère son groupement phosphate à la protéine régulatrice partenaire au niveau du résidu aspartate. Le RR phosphorylé pourra alors moduler l'expression de gènes cibles (Gao and Stock, 2009).

La cartographie de toutes les mutations connues devrait permettre à terme une meilleure connaissance de la structure fonctionnelle du système ParRS, mais ne devrait pas apporter d'informations décisives sur la nature des signaux perçus par lui. En effet, bien que ParRS soit activé en réponse à la présence de peptides cationiques dans le milieu de culture (Fernandez *et al.*, 2010), il n'est pas certain que ces molécules se fixent sur le senseur ParS. Par exemple, chez *Salmonella enterica*, l'activation du phospho-relais RcsCDB passe par la relocalisation d'une lipoprotéine de la membrane externe, RcsF, dans l'espace périplasmique ou la

membrane cytoplasmique sous l'effet des peptides cationiques (Farris *et al.*, 2010). La voie d'activation de l'opéron *mexXY* par ParRS est elle-même mal connue. Des travaux du laboratoire ont montré que la protéine ParR phosphorylée ne se fixait pas de façon significative sur la région intergénique *mexZ-mexXY* (Katy Jeannot, non publié). Il faut donc admettre l'existence d'une régulation indirecte de l'expression de l'opéron d'efflux par le système à deux composants. L'inactivation de plusieurs des gènes appartenant au régulon ParR n'ayant pas supprimé l'induction de *mexXY* par la colistine, reste la possibilité d'une modulation de l'activité du répresseur MexZ par un ligand naturel que l'équipe cherche désormais à identifier.

Au final, la prévalence des différents types de mutants MexXY++ en clinique semble cohérente avec le fait que la fréquence d'apparition d'une mutation capable de compromettre la fonctionnalité d'une protéine (*agrZ*) est plus importante que celle conférant un gain de fonction (*agrW2*) ou conduisant à une altération partielle de la synthèse protéique (*agrWI*). Les données *in vitro* viennent confirmer l'émergence préférentielle des mutants *agrZ* (2.10^{-7} à 10^{-6}) par rapport aux mutants *agrW* (5.10^{-8} à 2.10^{-7}) (Hocquet *et al.*, 2008). A ce stade, il serait intéressant de regarder si le contexte particulier de la mucoviscidose favorise l'émergence d'un type de mutants plutôt qu'un autre. D'après les données de la littérature, on peut s'attendre à observer une plus grande proportion de souches *agrZ* puisque *mexZ* est le gène le plus fréquemment muté parmi tous ceux que contient le génome, au cours de la colonisation pulmonaire chronique (Smith *et al.*, 2006). Pour l'instant, aucune donnée précise concernant les mutants de type *agrW* n'a été rapportée dans le cadre de la mucoviscidose.

Nos travaux ont également mis en évidence l'existence de souches MexXY++ persistantes et potentiellement épidémiques. Nous avons ainsi identifié dans notre collection de départ 10 isolats génotypiquement identiques à la souche 3060 (substitution V₄₈A dans MexZ), recueillis sur une période de 5 ans au CHU de Besançon. Leur génotype déterminé à l'aide de puces Clondiag (Alere®) correspond à celui d'un clone prévalent en Europe impliqué dans des infections aiguës. Ballarini *et al.* ont établi que celui-ci était à l'origine d'infections sévères chez des patients italiens hospitalisés en unités de soins intensifs ou en hématologie (Ballarini *et al.*, 2012). La mutation MexZ G₁₉₅D présente dans la souche 2508 et 4 autres isolats génotypiquement identiques a été également identifiée chez un clone épidémique international hautement résistant aux antibiotiques (Cabot *et al.*, 2012). Ce clone qui appartient au complexe clonal ST175 est porteur de diverses mutations dans (i) le gène de la porine OprD (Q₁₄₂X) à l'origine de sa résistance aux carbapénèmes, (ii) le gène du régulateur AmpR (G₁₅₄R) conduisant à la dérégulation de la β -lactamase naturelle AmpC et une

résistance élevée aux pénicillines, céphalosporines et monobactames, (iii) les gènes *gyrA* et *parC* (GyrA T₈₃I, D₈₇N ; ParC S₈₇W) déterminant une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones. En outre, le clone renferme, au sein d'un intégron de classe I, le gène *aadB* codant pour une enzyme modificatrice des aminosides (gentamicine, tobramycine). L'analyse de plusieurs autres isolats de type ST175 a montré que ces derniers possédaient tous les mêmes mutations dans les QRDR (*Quinolone Resistance Determining Regions*) des sous-unités GyrA et ParC mais pas nécessairement les autres marqueurs de résistance, acquis lors d'événements épidémiologiques distincts.

Les valeurs de CMI pour les 5 isolats ST175 de notre collection suggèrent que toutes ces souches expriment un mécanisme de résistance enzymatique touchant la tobramycine et la gentamicine (non montrée dans le **Tableau 22**), renferment des mutations dans les QRDR et produisent à bas niveau d'une β -lactamase. Le séquençage des gènes *ampR*, *oprD*, *gyrA*, *gyrB* et *parC* ainsi que l'amplification des intégrons de classe I sont en cours au laboratoire, ce qui permettra de vérifier si certaines de nos souches appartiennent au clone décrit par Cabot *et al.* (Cabot *et al.*, 2012).

Tableau 22. Sensibilité aux antibiotiques de l'isolat 2508 et des 4 isolats génétiquement identiques.

Souche	CMI (μ g/mL)									
	TOB	AMK	APR	CIP	FEP	CAZ	TIC	ATM	IPM	MEM
PAO1	0,5	4	16	0,25	4	2	16	≤ 4	$\leq 0,25/0-5$	$\leq 0,25/0,5$
CMZ091	1	8	32	0,5	8	2	16	≤ 4	$\leq 0,25/0-5$	$\leq 0,25/0,5$
2508	128	8	32	32	16	4	32	8	4	2
2718	128	8	32	32	16	4	32	16	1	$\leq 0,25$
2997	128	32	128	64	16	4	32	16	1	1
3076	128	8	32	32	8	2	32	16	16	4
3721	128	8	64	16	8	1	16	≤ 4	1	$\leq 0,25$

Certains isolats MexXY++ de notre collection sont apparus 2 à 8 fois plus résistants aux aminosides que les autres sans pour autant produire d'enzyme de modification, si on considère que l'apramycine n'est inactivée que par des enzymes assez rares chez *P. aeruginosa* telles que l'AAC(3)-IV ($\leq 0,1\%$ des souches dans l'étude internationale dirigée par Georges Miller ; (Miller *et al.*, 1994)). La délétion des gènes *mexXY* ou *oprM* a objectivé une résistance résiduelle chez les souches sélectionnées supérieure à celle des mutants PAO1 Δ *mexXY* et PAO1 Δ *oprM*, suggérant la présence d'un mécanisme non enzymatique s'ajoutant à l'efflux chez les isolats cliniques. Cette résistance additionnelle n'a pas pu être expliquée par un défaut de perméabilité de la membrane externe aux aminosides (*self-promoted uptake pathway*) ou encore par la présence d'un gène *oprM*-like à la fin de l'opéron *mexXY*, comme

c'est le cas chez la souche multi-résistante PA7 (gène dénommé *oprA*) (Morita *et al.*, 2012). Néanmoins, le criblage par Dötsch *et al.* d'une banque de mutants par insertion de transposon chez la souche PA14 a révélé que de nombreux déterminants génétiques peuvent, lorsqu'ils sont inactivés, entraîner une augmentation générale (entre 2 et 32 fois) de la résistance aux aminosides chez *P. aeruginosa* (Dötsch *et al.*, 2009). Les mécanismes sont multiples mais impliquent souvent des modifications des LPS ou des déficits dans le métabolisme énergétique et les chaînes respiratoires, aboutissant au final à un défaut d'accumulation intracellulaire des antibiotiques. De fait, les souches présentant des bas niveaux de résistance à tous les aminosides sans autre résistance associée ne sont pas rares dans le contexte clinique (observation non publiée). Des travaux récents du laboratoire ont conduit à l'identification de trois nouveaux loci impliqués dans la résistance aux aminosides chez la souche PAO1 (Katy Jeannot).

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons cherché à ré-évaluer la prévalence des souches de *P. aeruginosa* déficientes dans le système MexAB-OprM (MexAB-) au sein d'une large collection provenant de patients CF suivis au CHU de Besançon. Ce travail a mis en évidence que 89% des patients (7/8 enfants et 25/28 adultes) colonisés par *P. aeruginosa* étaient porteurs, à un moment ou à un autre, de mutants de ce type. Bien qu'isolées principalement au stade de colonisation chronique, ces bactéries peuvent apparaître très précocement chez l'enfant et persister malgré des traitements itératifs par β -lactamine. La surproduction constitutive de la β -lactamase AmpC (TicHS/M) qui masque le phénotype d'hypersensibilité à la ticarcilline survient chez un nombre croissant de mutants MexAB- au cours de la colonisation pour devenir fréquente à un stade avancé de la maladie. Ce phénomène qui est probablement favorisé par les traitements IV à base de ceftazidime ou de pipéracilline-tazobactam n'est toutefois pas indispensable à la persistance des mutants MexAB-, en particulier lorsque d'autres mutants peuvent assurer la protection des différentes sous-populations pulmonaires en relarguant de grandes quantités d'enzyme AmpC dans le mucus bronchique (Giwerzman *et al.*, 1992). Quoiqu'il en soit, il semble bien que les bactéries MexAB- donnent naissance aux mutants MexAB-/AmpC++ et non l'inverse, à savoir que les mutants AmpC++ deviennent MexAB-/AmpC++.

Chez 16 patients, aucune souche AmpC++ n'a été détectée parmi celles sélectionnées (entre 5 et 9 souches par patient). Ainsi, nous envisageons d'effectuer une analyse systématique de tous les isolats conservés par le laboratoire afin de déterminer si, même temporairement, ces 16 malades n'ont pas été colonisés par des mutants AmpC++.

Néanmoins, il est à l'heure actuelle bien établi que les phénotypes de résistance observés *in vitro* ne reflètent que partiellement l'état de sensibilité des souches *in vivo* (Smith *et al.*, 2003). En effet, la céphalosporinase naturelle AmpC peut être surproduite transitoirement en réponse à la présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotique inducteur dans le milieu (Livermore, 1995). De plus, le mode de vie en biofilm qu'adopte *P. aeruginosa* dans le poumon CF combiné à la présence d'un mucus particulièrement visqueux peut lui conférer un micro-environnement protecteur vis-à-vis des antibiotiques (Govan and Deretic, 1996).

Le niveau de sensibilité à la novobiocine apparaît comme un bon marqueur de la fonctionnalité du système MexAB-OprM, indépendant de la production de β -lactamase. En effet, pour des valeurs de CMI ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$, 99,2% des souches CF étaient des mutants MexAB- (\pm AmpC $^{++}$). Malgré sa bonne efficacité *in vitro* sur les souches déficientes, la novobiocine ne peut être utilisée chez les malades en raison de sa toxicité trop élevée. L'aztréonam et la témocilline étant également des substrats spécifiques de la pompe MexAB-OprM, leur activité est augmentée significativement chez les mutants MexAB-. On pourrait donc envisager d'utiliser des aérosols d'aztréonam-lysine (Cayston®) ou des injections de témocilline (Negaban®) pour cibler spécifiquement ces sous-populations, et épargner l'emploi d'autres β -lactamines telles que la ceftazidime et le méropénème. Toutefois, le risque de voir émerger des mutants AmpC $^{++}$ est à prendre en considération.

Nous avons également cherché à évaluer de façon indirecte si l'efflux du C12-HSL, un substrat de MexAB-OprM (Pearson *et al.*, 1999), est affecté dans les souches TicHS. Bien que le fond génétique des isolats cliniques ne soit pas connu, l'étude de la production et/ou de l'activité de divers facteurs de virulence, en point final comme en cinétique, chez des couples de souches isogéniques (MexAB $^{+}$ /MexAB $^{-}$) et des mutants *mexB::FRT* dérivant de PAO1 et PA14 n'a montré aucune tendance particulière. Ces résultats qui semblent contredire les données de la littérature sur le rôle de MexAB-OprM dans la virulence en lien avec le quorum sensing (Evans *et al.*, 1998) (Pearson *et al.*, 1999) devront être vérifiés. Par contre, le criblage d'une collection de souches CF isolées à différents moments de la maladie chez le même patient a confirmé qu'au stade chronique de nombreux facteurs de virulence sont perdus par les bactéries (Smith *et al.*, 2006).

Compte tenu de la forte prévalence de souches TicHS et TicHS/M dans le contexte de la mucoviscidose, on peut supposer que la perte de fonction de MexAB-OprM confère un avantage particulier à *P. aeruginosa*, en termes de fitness ou d'adaptation. Il est connu que des mutations peuvent augmenter la résistance bactérienne en diminuant l'affinité antibiotique-cible, comme dans le cas des fluoroquinolones et des topo-isomérases II. En

présence de concentrations inhibitrices d'antibiotique, l'avantage conféré en termes de croissance par des mutations de cible chez les souches non déficientes en efflux disparaît chez les souches déficientes comme si l'effet des mutations était masqué (Fange *et al.*, 2009). En d'autres termes, le maintien d'un efflux actif favoriserait l'émergence de populations résistantes. Or, la survenue de mutations dans les cibles des antibiotiques affectent généralement le fitness des bactéries (Kugelberg *et al.*, 2005). L'émergence de souches CF MexAB- pourrait donc limiter l'apparition de mutations délétères dans un contexte où le mode de vie en biofilm peut assurer, à lui seul, un haut niveau de résistance aux antibiotiques.

D'un autre côté, on pourrait considérer que l'efflux médié par MexAB-OprM n'est pas nécessaire à la survie dans le milieu pulmonaire CF et représente un coût énergétique que la bactérie peut reporter sur d'autres fonctions plus essentielles, telles que l'efflux des aminosides par la pompe MexXY/OprM. A cet égard, on remarquera que les souches CF ne sont que très rarement déficientes dans la protéine OprM pourtant codée par l'opéron *mexAB-oprM*. Il en va de même de l'opéron *mexXY* qui semble à l'abri des mutations. Afin d'identifier les avantages que représentent pour la bactérie l'inactivation de son principal système d'efflux, nous envisageons de réaliser une étude phénotypique sur les différents couples MexAB+/MexAB- construits en laboratoire *via* l'utilisation de puces Biolog® et de renouveler les expériences de compétition en co-culture dans un milieu synthétique se rapprochant, par sa composition, du mucus CF.

Au final, notre travail apporte un éclairage nouveau sur la capacité de *P. aeruginosa* à moduler l'activité de ses pompes d'efflux pour s'adapter aux milieux les plus hostiles. Les multiples mécanismes mis en oeuvre lors de ces évolutions montrent à quel point il est difficile de prévenir l'émergence de mutants résistants aux antibiotiques *in vivo*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Techniques microbiologiques

1. Souches bactériennes et plasmides utilisés

Ils sont répertoriés dans le **Tableau 23** et **Tableau 24**.

Tableau 23. Liste des souches utilisées.

Souches	Description	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<u>Souches de référence</u>		
PAO1	Souche sauvage de référence, sensible et prototrophe dont le génome a été re-séquencé	(Stover <i>et al.</i> , 2000)
PA14	Souche sauvage de référence, sensible et prototrophe	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PT5	PAO1 (Genève)	(Kohler <i>et al.</i> , 2000)
<u>Mutants construits <i>in vitro</i></u>		
PT712	PT5 $\Delta rhlA::gm$, Gm ^R	(Kohler <i>et al.</i> , 2000)
SG02	PAO1 <i>mexB::FRT</i>	cette étude
CMZ091	PAO1 $\Delta mexZ$	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
CM096	PAO1 $\Delta parRS$	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
CM106	CM096 complémenté avec les gènes <i>parRS</i> de PAOW2, insérés au site <i>attb</i> , Tet ^R	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
CM114	PAO1 $\Delta mexXY$	cette étude
CM115 (SG01)	PAO1 $\Delta oprM$	cette étude
CM116	CM096 complémenté avec les gènes <i>parRS</i> de PAO1, insérés au site <i>attb</i> , Tet ^R	cette étude
CM141	CM096 complémenté avec les gènes <i>parRS</i> de 2756, insérés au site <i>attb</i> , Tet ^R	cette étude
CM142	CM096 complémenté avec les gènes <i>parRS</i> de 2794, insérés au site <i>attb</i> , Tet ^R	cette étude
CM143	CM096 complémenté avec les gènes <i>parRS</i> de 2946, insérés au site <i>attb</i> , Tet ^R	cette étude
CM144	CM096 complémenté avec les gènes <i>parRS</i> de 3136, insérés au site <i>attb</i> , Tet ^R	cette étude
CM145	CM096 complémenté avec les gènes <i>parRS</i> de 3562, insérés au site <i>attb</i> , Tet ^R	cette étude
CM146	CM096 complémenté avec les gènes <i>parRS</i> de 3726, insérés au site <i>attb</i> , Tet ^R	cette étude
CM147	CM096 complémenté avec les gènes <i>parRS</i> de 3728, insérés au site <i>attb</i> , Tet ^R	cette étude
<u>Mutants spontanés sélectionnés <i>in vitro</i></u>		
PAOW1	Mutant spontané dérivé de PAO1, <i>agrWI</i> , substitution C ₁₂₆₂ G dans le gène <i>PA0668.4</i> (allèle 1) codant l'ARN ribosomal 23S	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
KJD9	Mutant spontané dérivé de PAO1, <i>agrWI</i> , substitution C ₂₁₂₁ A dans le gène <i>PA4280.2</i> (allèle 2) codant l'ARN ribosomal 23S	(Muller <i>et al.</i> en préparation)

PAOW2	Mutant spontané dérivé de PAO1, <i>agrW2</i> , substitution M ₅₉ I dans la protéine ParR	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5a	F' <i>supE44 endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) thi-1 recA1 Δ(argF-lacZYA)U169 φ80dlacZΔM15 phoA gyrA96 relA1 deoR λ</i>	Invitrogen
CC118	Δ(<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB</i> <i>argE</i> (Am) <i>recA1</i>	(Manoil and Beckwith, 1985)
CC118 (λpir)	CC118 lysogène pour le phage λpir	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 pro A2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1</i>	(Lacks and Greenberg, 1977)
S17.1	<i>recA, thi, pro, hsdRM</i> + RP4-2 (Tc::Mu, Km::Tn7), Tmp ^R , Stm ^R	(Simon <i>et al.</i> , 1986)
Gm ^R : résistance à la gentamicine, Tet ^R : résistance à la tétracycline, Stm ^R : résistance à la streptomycine, Tmp ^R : résistance au triméthoprim. FRT : <i>Flippase Recognition Target</i> .		

Tableau 24. Liste des plasmides utilisés.

Plasmides	Description	Références
pUC18	Vecteur de clonage multicopies, Ap ^R	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pEX100Tlink	oriT ⁺ <i>sacB</i> ⁺ , vecteur de recombinaison homologue contenant le site multiple de clonage de pUC18, Ap ^R	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pEXΔBrec	Fragment de 1052 pb du gène <i>mexB</i> cloné dans le vecteur pEX100Tlink, Ap ^R , Gm ^R	Thèse F. El'Garch
pCR2.1-TOPO	Vecteur de clonage Ap ^R , Km ^R	Invitrogen
pKNG101	Vecteur suicide de clonage, <i>oriR6K, sacB, mobRK2</i> , Sm ^R	(Kaniga <i>et al.</i> , 1991)
pRK2013	Vecteur de conjugaison dérivé de pRK2, <i>mob1, tra1, colE1</i> , Km ^R	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)
mini-CTX1	Vecteur d'intégration chromosomique au site <i>attB</i> de <i>P. aeruginosa</i> , V-FRT- <i>attPMCS, oriT, int</i> , Tet ^R	(Hoang <i>et al.</i> , 2000)
PCRΔ<i>mexXY</i>	Amplicons de 849 et 805 pb entourant l'opéron <i>mexXY</i> , clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO, Ap ^R , Km ^R	cette étude
pKNGΔ<i>mexXY</i>	Fragment <i>Bam</i> HI/ <i>Apa</i> I du vecteur pCRΔ <i>mexXY</i> cloné dans le vecteur pKNG101, Sm ^R	cette étude
pCRΔ<i>oprM</i>	Amplicons de 519 et 547 pb entourant le gène <i>oprM</i> , clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO, Ap ^R , Km ^R	cette étude
pKNGΔ<i>oprM</i>	Fragment <i>Spe</i> I/ <i>Apa</i> I du vecteur pCRΔ <i>oprM</i> cloné dans le vecteur pKNG101, Sm ^R	cette étude
PCRPAO1	Amplicon de 2314 pb contenant les gènes <i>parRS</i> de la souche PAO1 clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO, Ap ^R , Km ^R	cette étude
mini-CTXPAO1	Fragment <i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RV de 2367 pb de PCRPAO1 cloné dans le vecteur mini-CTX1, Tet ^R	cette étude
PCR2946	Amplicon de 2314 pb contenant les gènes <i>parRS</i> de la souche 2946, cloné dans le vecteur pCR2.1-TOPO, Ap ^R , Km ^R	cette étude

mini-CTX2946	Fragment <i>SpeI/EcoRV</i> de 2367 pb de PCR2946 cloné dans le vecteur mini-CTX1, Tet ^R	cette étude
PCR3136	Amplicon de 2314 pb contenant les gènes <i>parRS</i> de la souche 3136, cloné dans le vecteur pCR2.1-TOPO, Ap ^R , Km ^R	cette étude
mini-CTX3136	Fragment <i>SpeI/EcoRV</i> de 2367 pb de PCR3136 cloné dans le vecteur mini-CTX1, Tet ^R	cette étude
PCR3562	Amplicon de 2314 pb contenant les gènes <i>parRS</i> de la souche 3562, cloné dans le vecteur pCR2.1-TOPO, Ap ^R , Km ^R	cette étude
mini-CTX3562	Fragment <i>SpeI/EcoRV</i> de 2367 pb de PCR3562 cloné dans le vecteur mini-CTX1, Tet ^R	cette étude
PCR3726	Amplicon de 2314 pb contenant les gènes <i>parRS</i> de la souche 3726, cloné dans le vecteur pCR2.1-TOPO, Ap ^R , Km ^R	cette étude
mini-CTX37266	Fragment <i>SpeI/EcoRV</i> de 2367 pb de PCR3726 cloné dans le vecteur mini-CTX1, Tet ^R	cette étude
PCR3728	Amplicon de 2314 pb contenant les gènes <i>parRS</i> de la souche 3728, cloné dans le vecteur pCR2.1-TOPO, Ap ^R , Km ^R	cette étude
mini-CTX3728	Fragment <i>SpeI/EcoRV</i> de 2367 pb de PCR3728 cloné dans le vecteur mini-CTX1, Tet ^R	cette étude
mini-CTX2756	Amplicon de 2332 pb contenant les gènes <i>parRS</i> de la souche 2756, cloné dans le vecteur mini-CTX1, Tet ^R	cette étude
mini-CTX2794	Amplicon de 2332 pb contenant les gènes <i>parRS</i> de la souche 2794, cloné dans le vecteur mini-CTX1, Tet ^R	cette étude

Ap^R : résistance à l'ampicilline, Gm^R : résistance à la gentamicine, Km^R : résistance à la kanamycine, Sm^R : résistance à la streptomycine, Tet^R : résistance à la tétracycline. MCS : *Multiple Cloning Site*.

2. Milieux de culture

Les milieux MH (Mueller-Hinton) solide et liquide (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), MHc (Mueller-Hinton calibré) dont la concentration en cations divalents Ca²⁺ et Mg²⁺ est ajustée (Becton Dickinson), le milieu PIA solide (*P*seudomonas *I*solation *A*gar) (Becton Dickinson), le milieu liquide cœur-cerveille (Bio-Rad) et le milieu minimum M9 contenant 5 % de sucrose comme unique source de carbone ont été utilisés pour les cultures bactériennes. Ceux-ci ont été rendus sélectifs par l'addition de 100 µg/mL d'ampicilline (GlaxoSmithKline, Marly le Roi, France), 25 µg/mL de kanamycine (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 50 µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), gentamicine (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich) pour les souches de *E. coli* et 150 µg/mL de ticarcilline (GlaxoSmithKline, Marly le Roi, France), 2000 µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 200 µg/mL de gentamicine (Sigma-Aldrich) pour les souches de *P. aeruginosa*.

3. *Mesure de la croissance bactérienne*

Une suspension bactérienne obtenue, soit par dilution d'une culture de la nuit ($\approx 5.10^8$ UFC/mL), soit à partir d'une culture fraîche sur milieu MH solide ($\approx 6,4.10^7$ UFC/mL) dans 30 mL de MH liquide préchauffé, a été placée à 37°C (+/- 0,1°C) ou 44°C (+/- 0,1°C) sous agitation (250 rpm) durant 7 h. Le développement bactérien a été évalué par une mesure de l'absorbance à 600 nm.

4. *Détermination de la sensibilité aux antibiotiques*

4.1. *Antibiogrammes*

Les antibiogrammes ont été réalisés par la technique de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) (CA-SFM, 2010). Brièvement, une gélose MH a été inondée avec une suspension bactérienne d'opacité équivalente à 0,5 McFarland diluée au 1/100^{ème} ($\approx 1,5.10^6$ UFC/mL). Un distributeur a été ensuite employé pour le dépôt de disques pré-imprégnés d'antibiotique (Bio-Rad). Enfin, la lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après 18 h à 24 h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C).

4.2. *Détermination de la CMI en milieu gélosé*

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents antibiotiques d'intérêt ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu gélosé. Un multi-ensemencement de Steers a été utilisé pour le dépôt de 1 µL d'une suspension bactérienne préalablement ajustée à 0,5 McF puis diluée au 1/10^{ème} ($\approx 1,5.10^7$ UFC/mL) à la surface d'une gélose MH (MHc pour les aminosides) renfermant des concentrations croissantes d'antibiotique de raison 2. La CMI, définie par l'absence de croissance à partir d'une concentration donnée d'antibiotique a été déterminée après 18 h à 24 h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C).

4.3. *Détermination de la CMI de la colistine en milieu liquide*

La CMI de la colistine a été déterminée par une technique de macro-dilution en milieu liquide. Une gamme de concentrations croissantes de raison 2 a été ensemencée avec un

inoculum bactérien d'environ 5.10^5 UFC/mL dans un volume final de 2 mL de MHc. La CMI a été déterminée après 18 h à 24 h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C) sans agitation.

4.4. Détermination de la CMI du sulfaméthoxazole par E-test®

La CMI du sulfaméthoxazole a été déterminée avec des bandelettes E-test® pré-imprégnées d'un gradient d'antibiotique (Biomérieux, Durham, Angleterre). Celles-ci ont été déposées sur géloses MH préalablementensemencées par écouvillonnage, à partir d'une suspension bactérienne d'opacité égale à 0,5 McFarland ($\approx 1,5.10^8$ UFC/mL). Après 18 h à 24 h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C), la CMI a été lue à l'intersection de la zone d'inhibition et de la bandelette (**Figure 40**).

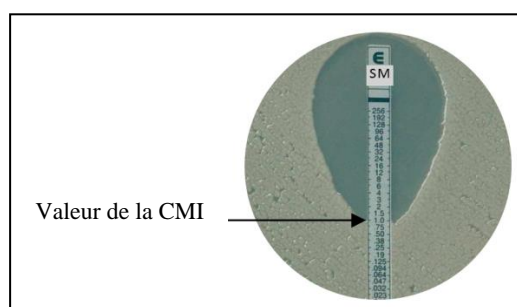


Figure 40. Détermination de la CMI par E-test®.

5. Etude de l'activité perméabilisante membranaire des aminosides

5.1. Préparation des échantillons

Un inoculum bactérien d'environ $6,4.10^7$ UFC/mL, obtenu à partir de colonies se développant sur gélose MH puis mises en suspension dans 30 mL de bouillon MH préchauffé, a été placé à 37°C (+/- 0,5°C) sous agitation (250 rpm) jusqu'à une absorbance de 0,5 unités à 600 nm. Après une centrifugation à 3000 g pendant 10 min, le culot a été resuspendu dans un tampon HEPES 5 mM pH 7,2 additionné de 1 mM de KCN pour atteindre une absorbance de 0,5. L'acquisition des mesures a été réalisée après une incubation de 30 min à température ambiante.

5.2. Mesure de la fluorescence

Cette technique permet d'évaluer le pouvoir déstabilisant des antibiotiques sur la membrane externe à l'aide d'une sonde, le NPN (1-N-phényl-naphthylamine), qui fluoresce dans les environnements non polaires ou hydrophobes tels que l'intérieur des membranes bactériennes. Ainsi, 20 μL d'une solution d'acétone contenant 0,5 mM de NPN (concentration finale 10 μM) ont été ajoutés à 1 mL de la suspension bactérienne décrite ci-dessus. Puis, 10 μL d'antibiotique ont été ajoutés au mélange réactionnel (polymyxine B à une concentration finale de 6,4 $\mu\text{g/mL}$, gentamicine à 5, 25, 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$). La perméabilisation de la membrane externe par les antibiotiques a été appréciée en suivant les variations de fluorescence du milieu à l'aide d'un spectrofluorimètre (longueur d'onde d'excitation : 350 nm, longueur d'onde d'émission : 420 nm) disponible sur la plateforme Dimacell (Plateau d'Imagerie Spectroscopique PIMS, Dijon, France) (Loh *et al.*, 1984).

6. Evaluation de la virulence

6.1. Mesures en « end-point »

6.1.1. Production de rhamnolipides

La production de rhamnolipides a été évaluée de façon semi-quantitative après le dépôt de 3 μL d'une culture bactérienne ajustée à 0,5 Mac Farland sur un milieu minimum M8 (Na_2HPO_4 42 mM, KH_2PO_4 22 mM, NaCl 8 mM, pH 7,4) auquel ont été rajoutés 0,2 % de glucose (p/v), 2 mM de MgSO_4 , 0,0005 % de bleu de méthylène (p/v), 5 mM de KNO_3 , 0,02 % de CTAB (cétrimide) (p/v) et 1,6 % d'agar (p/v). La diffusion des rhamnolipides dans le milieu donne lieu à l'apparition d'un halo bleu foncé autour du spot après 24 h à 48 h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C) (**Figure 41**) (adapté de (Inka Siegmund, 1991)).

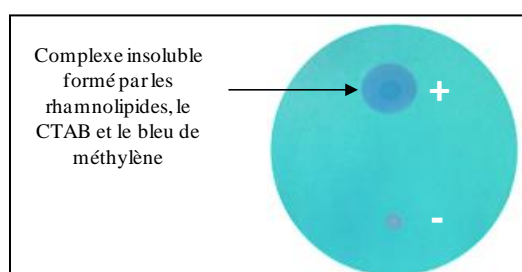


Figure 41. Mise en évidence de la production de rhamnolipides.

6.1.2. *Activité hémolytique*

L'activité hémolytique a été mise en évidence après le dépôt de 3 μL d'une suspension bactérienne ajustée à 0,2 McF ($\approx 6.10^7$ UFC/mL) à la surface d'une gélose Columbia enrichie en sang de cheval (5 %) (Bio-Rad). La lyse des hématies se traduit par l'apparition d'une zone claire entourant le spot après 24 h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C) (**Figure 42**).

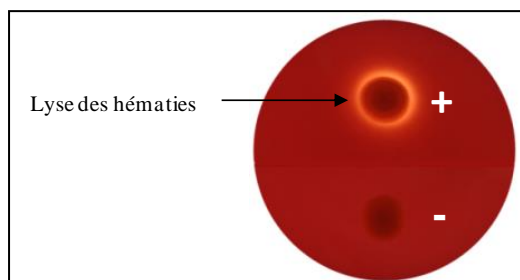


Figure 42. Mise en évidence de l'activité hémolytique.

6.1.3. *Activité de la phospholipase C*

Cent μL d'une suspension bactérienne à 0,2 McF réalisée à partir de colonies obtenues sur gélose au sang de mouton (5 %) (Bio-Rad) ont été ajoutés à 2 mL d'un bouillon tryptone (Tris-HCl 120 mM pH 7,2 ; tryptone 0,1 % (p/v); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM ; CaCl_2 1,6 mM ; KCl 10 mM ; glucose 50 mM et citrate tri-sodique 24 mM) puis incubés 24 h à 37°C (+/- 0,1°C) sous agitation (250 rpm). Les cultures ont été centrifugées pendant 5 min à 14 000 g puis, leur surnageant mélangé à 5 mg de charbon actif avant une seconde centrifugation dans les mêmes conditions. Quatre-vingt-dix μL de réactif NPPC (Tris-HCl 250 mM pH 7,2 ; 60 % de sorbitol (p/v) ; ZnSO_4 1 μM ; NitroPhényl-PhosphorylCholine 10 mM) ont ensuite été ajoutés à 10 μL de surnageant. L'hydrolyse du NPPC en nitrophénol jaune, sous l'effet de la phospholipase C, a été quantifiée après 1 h et 2 h d'incubation à 37°C (+/- 0,1°C) en mesurant l'absorbance du mélange réactionnel à 405 nm (adapté de (Berka *et al.*, 1981)). Les mesures ont été effectuées en triples.

6.1.4. *Activité des protéases*

L'activité des protéases a été estimée de façon semi-quantitative après le dépôt de 3 μL d'un inoculum bactérien ajusté à 0,2 McF à la surface d'une gélose renfermant du lait (extrait de levure 3g/L, peptones 5 g/L, lait en poudre 5 g/L, agar 15 g/L, pH 7,2). La dégradation de

la caséine se traduit par l'apparition d'une zone claire autour du spot après 24 h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C) (**Figure 43**).

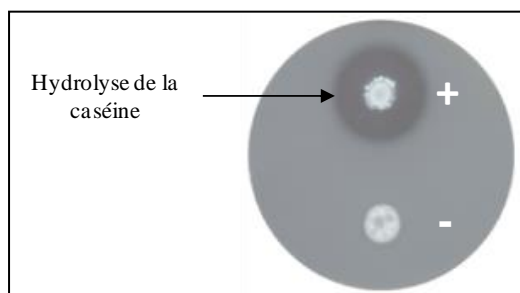


Figure 43. Mise en évidence de l'activité des protéases.

6.1.5. Dosage spectrométrique de la pyocyanine

Cent μL d'une suspension bactérienne à 0,2 McF, réalisée à partir de colonies isolées sur gélose enrichies en sang de mouton (5%) (Bio-Rad), ont été ajoutés à 2 mL d'un milieu tryptone (Tris-HCl 120 mM pH 7,2 ; tryptone 0,1 % (p/v) ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM ; CaCl_2 1,6 mM ; KCl 10 mM ; glucose 50 mM et citrate tri-sodique 24 mM) puis incubés 24 h à 37°C (+/- 0,5°C) sous agitation (250 rpm). Les cultures (**Figure 44**) ont ensuite été centrifugées pendant 5 min à 14 000 g et le pigment bleu extrait à deux reprises par 500 μL de chloroforme. Après élimination de la phase supérieure, la phase organique a été acidifiée par ajout, en deux fois, de 1 mL d'HCl 0,2 M, transformant ainsi la pyocyanine en un pigment rose. La concentration de ce pigment a été mesurée par spectrométrie à 520 nm (adapté de (Essar *et al.*, 1990)). Les mesures ont été effectuées en triples.

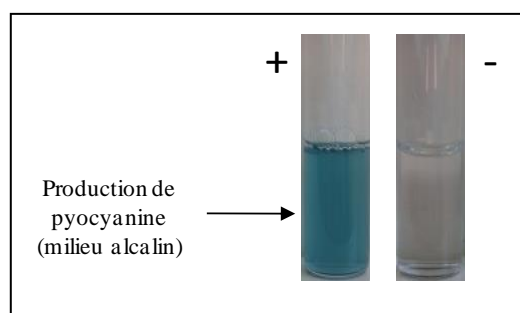


Figure 44. Mise en évidence de la production de pyocyanine.

6.1.6. Production de pyoverdine

La production de pyoverdine a été estimée de façon qualitative après ensemencement d'un milieu de King B (Bio- Rad) avec une suspension bactérienne. La production de pyoverdine, stimulée par la concentration importante du milieu en phosphate dipotassique et

en sulfate de magnésium, entraîne le virage du milieu qui devient vert fluorescent après 24 h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C) (**Figure 45**).

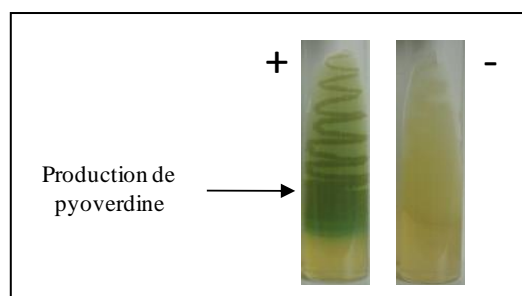


Figure 45. Mise en évidence de la production de pyoverdine.

6.1.7. Mise en évidence du swimming

Le dépôt d'un spot de 5 µL d'une suspension bactérienne à 0,2 McFarland à la surface d'un milieu LB à 0,3 % d'agar (p/v) permet de visualiser la nage des bactéries en milieu semi-solide grâce à l'activité du flagelle polaire, après incubation des boîtes à 30°C (+/- 0,5°C) en atmosphère humide pendant 48 h (**Figure 46**) (Kohler *et al.*, 2000).

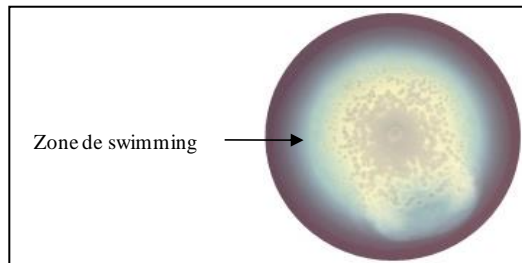


Figure 46. Mise en évidence de la mobilité par swarming.

6.1.8. Mise en évidence du twitching

Un cure-dent a été utilisé pour déposer, par piqûre, une colonie bactérienne à l'interface entre le fond d'une boîte de Petri et une couche de milieu LB renfermant 1 % d'agar (p/v). Cette technique permet la mise en évidence de l'activité des pili de type IV. Ces appendices sont capables de se prolonger, de s'attacher à un substrat solide et de rétracter permettant ainsi aux cellules de se déplacer sur une surface rigide. Après 24 h à 48 h d'incubation à 37°C (+/- 0,1°C), la zone de croissance au contact du plastique entourant le point d'inoculation a été révélée par coloration à l'aide d'une solution de crystal violet 1 % (p/v) (**Figure 47**) (Deziel *et al.*, 2001).

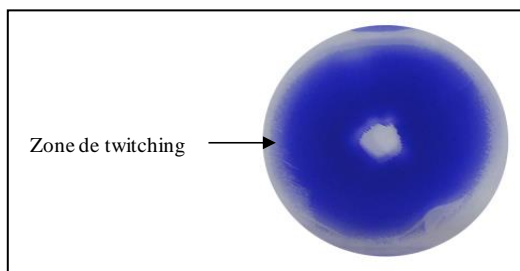


Figure 47. Mise en évidence de la mobilité de type twitching.

6.1.9. Mise en évidence du swarming

Cinq μL d'une suspension bactérienne à 0,2 McFarland ont été déposés à la surface d'un milieu minimum M8 supplémenté par 0,2 % de glucose, 2 mM de MgSO_4 , 0,5 % d'hydrolysate de caséine (p/v) et 0,5 % d'agar. La mobilité par swarming due à l'action combinée des rhamnolipides, des pili et du flagelle donne lieu à la formation de dendrites, après 24 h d'incubation à 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) (**Figure 48**) (Kohler *et al.*, 2000).

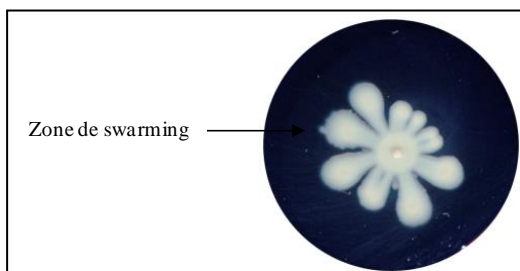


Figure 48. Mise en évidence de l'activité combinée des rhamnolipides, des pili et du flagelle.

6.2. Mesures en cinétique

6.2.1. Activité des rhamnolipides

Une suspension bactérienne ajustée à 0,5 unité d'absorbance à 600 nm dans un milieu MH a été placée à 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) sous agitation (250 rpm) durant 7 h. Toutes les heures, deux aliquotes ont été prélevées. Une fraction a été utilisée pour la mesure de l'absorbance à 600 nm et la seconde centrifugée pendant 5 min à 14 000 g. Le surnageant a été conservé à 4°C jusqu'à la fin de l'expérience. Un volume de surnageant a été ensuite ajouté à un volume de sang de cheval défibriné dilué au 1/100ème dans du tampon PBS. Après une incubation de 30 min à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min à 950 g. L'activité hémolytique a été évaluée par la mesure de l'absorbance à 405 nm. La souche

sauvage (PT5=PAO1) a servi de témoin positif et le mutant PT712 (*rhlA::gm*) de témoin négatif (**Figure 49**). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la lyse totale des globules rouges par le Triton X-100.

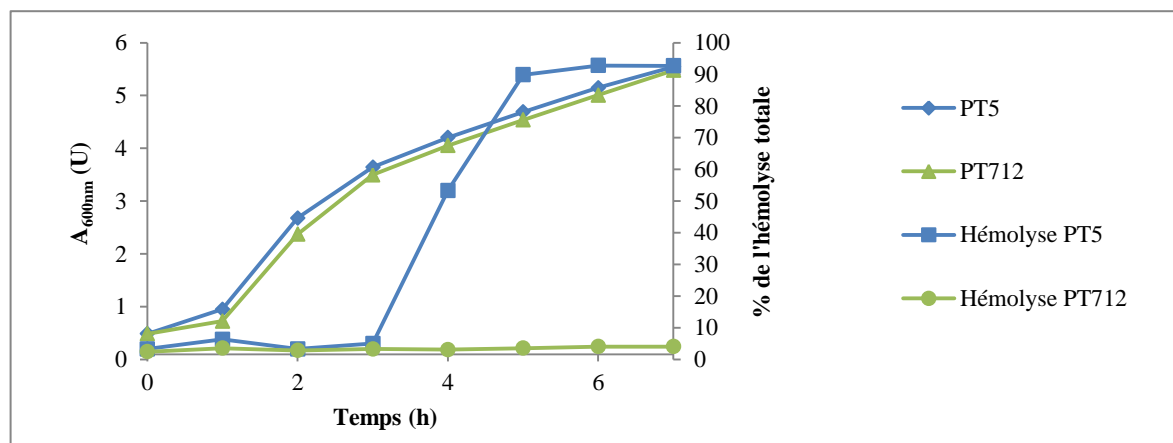


Figure 49. Activité hémolytique de la souche sauvage PT5 et du mutant PT712 (*rhlA::gm*) au cours de la croissance.

6.2.2. Activité de l'élastase

Une suspension bactérienne ajustée à 0,5 unités de DO_{600nm} en milieu MH a été incubée à 37°C (+/- 0,5°C) dans un shaker (250 rpm) durant 7 h. Toutes les heures, deux aliquotes ont été prélevées. Une fraction a été utilisée pour la mesure de l'absorbance à 600 nm et la seconde centrifugée 5 min à 14 000 g. Son surnageant a été conservé à 4°C jusqu'à la fin de l'expérience. Cinquante µL de surnageant ont été dilués dans 950 µL d'une solution de Tris 0,1 M, pH 7,4 ; CaCl₂ 1 mM puis un excès d'élastine rouge-congo (Elastin Company, Owensville, MO) a été ajouté (4 mg/mL). Après une incubation de 18 h à 37°C (+/- 0,5°C), les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min à 14 000 g. La dégradation de l'élastine rouge-congo conduit à la libération d'un produit coloré dont la concentration est déterminée au spectrophotomètre à 495 nm (Jeannot *et al.*, 2008).

7. Expériences de compétition

Une souche sauvage et son mutant TicHS ont été mis en co-culture (chacune à 10⁵ UFC/mL) dans un bouillon cœur-cerveille à 37°C (+/- 0,5°C) sous agitation (250 rpm). Toutes les 2 heures, 49 µL du mélange ont été déposés à l'aide d'un Spiral Plater (AES Laboratoire, Cranbury, USA) sur un milieu MH et un milieu MH contenant une concentration

de ticarcilline suffisante pour empêcher la croissance de la souche TicHS (de 4 à 10 mg/L). Après 24 h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C), les colonies ont été dénombrées sur les 2 milieux ce qui a permis de déterminer la proportion respective des 2 souches.

B. Techniques de biologie moléculaire

1. *Extraction d'acides nucléiques*

1.1. *Extraction d'ADN génomique*

L'extraction d'ADN génomique bactérien a été effectuée à l'aide du kit *Wizard[®] genomic DNA purification* (Proméga, Charbonnière-les-bains, France). Cette méthode consiste à lyser les bactéries puis à purifier l'ADN par chromatographie d'échange d'anions.

1.2. *Extraction d'ADN plasmidique*

La purification d'ADN plasmidique pour les expériences de clonage ou de séquençage a été effectuée au moyen du kit *Wizard[®] plus SV Minipreps DNA purification system* (Proméga). Brièvement, après une étape de lyse alcaline des bactéries, l'ADN est purifié par chromatographie d'échange d'anions.

2. *Amplification d'ADN par PCR*

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un thermocycleur Biometra T3 (Biolabo Scientific Instrument, Lausanne, Suisse) en présence de *RedTaq DNA polymerase[®]* (Bioline, Londres, Royaume-Uni) en respectant les conditions spécifiées par le fournisseur. Le choix des amorces a été effectué à l'aide du logiciel Primer 3 input 0.4.0 (<http://frodo.\ri.mit.edu/primer3/>). Celles-ci sont répertoriées dans le **Tableau 25**. L'amplification de 50 ng d'ADN a été réalisée dans un mélange réactionnel (50 µL) composé de 0,2 mM de chaque dNTP, 6 % de DMSO (v/v), 2,5 mM de MgCl₂, 0,6 µM de chaque amorce, 2,5 U de Taq polymérase et 5 µL de tampon Taq 10X. Les conditions d'amplification ont été les suivantes : après une dénaturation de l'ADN pendant 5min à 95°C, l'amplification a été réalisée en 30 cycles comprenant chacun : (i) 30 s de dénaturation à 94°C, (ii) 30 s à

60°C permettant l'hybridation des amorces et (iii) 40 à 90 s à 72°C pour l'élongation des fragments (60s/kb). Un cycle final d'élongation de 7 min à 72°C a été appliqué en fin de réaction.

Tableau 25. Liste des amorces utilisées.

Amorces (5' → 3')		Références
Séquençage		
<u>Region intergénique <i>mexX-mexZ</i></u>		
SeqZ1	GCAGCCCAGCAGGAATAG	(Hocquet <i>et al.</i> , 2003)
SeqZ2	GCCTGTCGGTCTCTACATC	(Hocquet <i>et al.</i> , 2003)
<u><i>parRS</i></u>		
SeqParSC1	GCCAGGCAGGGGAAATACT	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
SeqParSC2	CATACCAGCAGGGCGGATG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
SeqParSC3	AAGAACCTGCTGGTGGTACG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
SeqParSC4	ATGCGGATCTGTTCGACCT	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
SeqParSC5	CGAACTGGAGGAAATGGTCT	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
SeqParSC6	GAAAGATGCATTGCACGAAA	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
SeqParRC1	GCATATAATGCCAGCCGATT	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
SeqParRC2	GGTCGACCACGAAGATCG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
<u><i>PA5471.1</i></u>		
SeqPA5471.1S1	GGAGTCCTTCATGACCTTCG	cette etude
SeqPA5471.1S2	GTGGTTTGCAGTTGCTGGAT	cette etude
<u>Allèles codant pour l'ARNr 23S</u>		
SeqARNriboC2	TACCTTTTCAACGGGAGTGG	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqARNriboC3	CGTATGCGTACAAGCAGTGG	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqPA0668.1-5C1	CTTAATAAGGCGGGGTTGGT	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqPA0668.1-5C4	CATGGTCAACGTGGTGGTC	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqPA4280.1-5C1	TGGATTGATCGTGTCAAGA	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqPA4280.1-5C4	AACTGCAGGCCATGTTTCAG	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqPA4690.1-5C1	GAGTGGACCCTGTACGCTGT	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqPA4690.1-5C4	GTTTCCATTGATGGCGATG	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqPA5369.1-5C1	TTCCTACAACCTGGCCTACG	(Muller <i>et al.</i> en préparation)

SeqPA5369.1-5C4	CGCTGGCTTTCTGATATTCC	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC1	AACACCAGAGGTTCGTCCAC	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC2	ATCGCTGTGAAGATGCAGTG	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC3	ATGCCAGGGTGGTATTTCAA	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC4	GTAAATCCGGGGTTTCAAGG	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC5	TTTCGCTACGCCTACCCTAT	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC6	GCGAATGTCGTCTTCACAGT	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC7	ACCGTATGCGCTTCTTCACT	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC8	TGTCACGGTGAATACGTTCC	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC9	ACTTCTGGAGCAACCCACTC	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC10	TGGGGAGCAAACAGGATTAG	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC11	CTGCGCCACTATGATCTCAA	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC12	GGAGAAAGTGGGGGATCTTC	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC13	CGTAGGAGTCTGGACCGTGT	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC14	GTGCTTGACAGCGAATTTGA	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC15	TCTCTCAAGCGCCTTGGTAT	(Muller <i>et al.</i> en préparation)
SeqComARNriboC16	TCGTGAAAAGGGAAACAACC	(Muller <i>et al.</i> en préparation)

mexAB-oprM

SeqpMexAS1	GATCTTCCGGGTGATCAGTG	cette étude
SeqpMexAS2	GTTCGTTGCATAGCGTTGTC	cette étude
SeqMexAS1	GAGGCTTTCGGACGTTTACA	cette étude
SeqMexAS2	GCCTTGGACTGCAGGTAGG	cette étude
SeqMexAS3	TACGAGGCCGACTACCAGAG	cette étude
SeqMexAS4	AGGATGGCCTTCTGCTTGAC	cette étude
SeqMexAS5	CTGAAGCTGGAGGACGGTAG	cette étude
SeqMexAS6	CGAAAATGGGCCTATCAATG	cette étude
SeqMexBS1	CAAGTGGCTGGTTACCGAAG	cette étude
SeqMexBS2	CTTGTTCTGCACCTGGACCT	cette étude
SeqMexBS3	GATCGACAATCTGCGCTACA	cette étude
SeqMexBS4	GCAGGATGTTCTCGAATTGC	cette étude
SeqMexBS5	GCAGAACGTGCAGATTTCCCT	cette étude
SeqMexBS6	GAACATGGTCAGGGTGTGTA	cette étude
SeqMexBS7	CCTGTTCCCTGCAGAACTTCC	cette étude
SeqMexBS8	CGATCACCACGTAGATCAGC	cette étude

SeqMexBS9	TTCAACCGGATGTTTCCTTTC	cette étude
SeqMexBS10	CGAGCATGAGGAACTTGTTG	cette étude
SeqMexBS11	GCAGATGCACTTCTTCAGCTT	cette étude
SeqMexBS12	GCAATTGCTTGACGATCTCC	cette étude
SeqMexBS13	GATGAACCCGGACGACCT	cette étude
SeqMexBS14	GCGAACTCCACGATGAGAAT	cette étude
SeqMexBS15	TGTCCAACGACGTGTTCTTC	cette étude
SeqMexBS16	GGTGTCTGCCCCGTAGGC	cette étude
SeqOprMS1	GCTGATCCCCGACTACCAG	cette étude
SeqOprMS2	TGGGTCAGGTCGAACTCTT	cette étude
SeqOprMS3	CTGGGAACTCGATCTCTTCG	cette étude
SeqOprMS4	GCTGATGCTCGGGAAGAAC	cette étude
SeqOprMS5	CTACGCGAAGATCCAGAAGG	cette étude
SeqOprMS6	GATCAACAAGCGCGACCT	cette étude

Recherche d'un gène « *oprM* like »

OprAS1	AGCCGAACCTGTTCTACCG	cette étude
OprAS2	GTGTTCTGGTACCGCTGTT	cette étude

Inactivation génique

mexXY

PCRimexXYC1	CCAGCAACAGGTAGGGAGAA	Thèse C. Muller
PCRimexXYC2	CGGTACAGGAATAGGGCGACCAG	Thèse C. Muller
PCRimexXYC3	ATTCTGTGTAACCGTGTTCCTCTGGT	Thèse C. Muller
PCRimexXYC4	CAACGCCCGGAAGTTCTC	Thèse C. Muller

oprM

PCRioprMS1	TACGAAAGCTGGTCGATTCC	cette étude
PCRioprMS2	GCGATCAGACAGAACGACAGCGGCTAC	cette étude
PCRioprMS3	TTCTGTCTGATCGCCTTCCGCGCCATG	cette étude
PCRioprMS4	ACTTCGACAATTTTCGGCAAC	cette étude

Complémentation chromosomique

parRS

CloparRSC1	GAGGGAAAAGCAGAAGTCACC	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
------------	-----------------------	-------------------------------

CloparRSC2	CGAGGTGTCCCATGCTAGG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
CloparRSBamHIS1	CTC <u>GGATCC</u> GAGGGAAAAGCAGAAGTCACC	cette étude
CloparRSHindIIIS2	CTCA <u>AAGCTT</u> CGAGGTGTCCCATGCTAGG	cette étude

RT-qPCR

rpsL

RTTrpsL1	GCAACTATCAACCAGCTGGTG	(Dumas <i>et al.</i> , 2006)
RTTrpsL2	GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG	(Dumas <i>et al.</i> , 2006)

mexY

RTmexY1A	TTACCTCCTCCAGCGGC	(Jeannot <i>et al.</i> , 2005)
RTmexY1B	GTGAGGCGGGCGTTGTG	(Jeannot <i>et al.</i> , 2005)

PA5471

RTPA5471C1	GAAGGCAAGGCGATCCAG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
RTPA5471C2	AGGCGCTTTTCCAGTTTGT	(Muller <i>et al.</i> , 2011)

PA1797

RTPA1797C1	GGACCCTTTGCAGATGACTC	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
RTPA1797C2	CGGAGTGTTTCCTGAGAAGC	(Muller <i>et al.</i> , 2011)

arnA

RTarnAC1	GTGGCTCGAATACCATGTGA	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
RTarnAC2	TGCCGTATTTACGCAGTAG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)

Les séquences nucléotidiques complémentaires permettant la PCR chevauchante pour l'inactivation génique apparaissent en rouge et vert. Les sites de restriction ajoutés aux amorces sont soulignés.

3. Electrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN obtenus après amplification par PCR ou restriction enzymatique ont été séparés en fonction de leur taille par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 0,8, 1,2 ou 2 % (p/v) dans un tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) pendant une durée d'approximativement 1 h et sous une tension d'environ 100V (ces paramètres étant adaptés aux conditions de l'expérience). Après immersion du gel pendant 15 min dans une solution de BET (0,5 µg/mL), l'ADN a été visualisé à l'aide du système UV ChemiDoc XRS muni du logiciel QuantityOne® (Bio-Rad).

4. *Purification des fragments d'ADN*

Les amplicons ou les produits de restriction ont été purifiés sur des colonnes de silice à l'aide du Kit *Wizard® SV gel and PCR clean up system* (Proméga) ou par la méthode classique de précipitation à l'acétate de sodium (Ausubel, 2000). L'ADN a ensuite été élué par 50 µL d'eau sans ADNase, ni ARNase, puis dosé au spectrophotomètre à 260 nm. Une unité d'absorbance à cette longueur d'onde correspond à une concentration équivalente à 50 ng/µL d'ADN double brin ou à 40 ng/µL d'ARN. La pureté de l'extrait a été contrôlée par le calcul du rapport (A_{260nm}/A_{280nm}) qui doit être compris entre 1,8 et 2.

5. *Séquençage de l'ADN*

Le séquençage de l'ADN a été effectué par la plate-forme « Séquençage-Analyse de fragments » de la SFR 4234 de Besançon selon la méthode des didésoxynucléotides de Sanger, à l'aide du séquenceur automatique Applied Biosystems 3130 (Life technologies, Californie, USA).

6. *Techniques de clonage*

6.1. *Hydrolyse de l'ADN par les endonucléases de restriction*

Les restrictions enzymatiques de l'ADN plasmidique ou des amplicons obtenus par PCR ont été effectuées pendant 2 h à 37°C (+/- 0,1°C) selon les recommandations du fournisseur (Roche Diagnostics, Meylan, France ou Proméga).

6.2. *Ligature des fragments d'ADN*

Les fragments d'ADN ont été ligaturés par l'ADN ligase du bactériophage T4 (Proméga) qui catalyse la formation de liaison phospho-diesters entre les groupements 5'-phosphate et 3'-hydroxyle de molécules d'ADN bicaténaïres ayant des extrémités franches ou cohésives. Les ligatures ont été réalisées en utilisant 100 ng de vecteur linéarisé avec un rapport insert/vecteur de 3 pour des extrémités cohésives et de 1 pour des extrémités franches. La quantité d'insert nécessaire à la réaction a été calculée selon la formule ci-dessous :

$$\text{Quantité d'insert (ng)} = \frac{(\text{taille de l'insert (kb)} \times \text{quantité de vecteur})}{\text{taille du vecteur (kb)}}$$

L'insert et 100 ng de vecteur linéarisé ont été ajoutés à 4 mL de tampon ligase (5X) et 1 U de ligase T4. Le volume du mélange réactionnel, ajusté à 20 µL avec de l'eau pure, a été incubé pendant 16 h à 4°C (+/- 0,1°C).

7. Transformation bactérienne

7.1. Transformation par choc thermique de cellules de *E. coli* rendues compétentes par le chlorure de rubidium

Cette technique décrite en 1983 (Hanahan, 1983) permet d'obtenir environ 10^7 transformants par µg d'ADN. Brièvement, les bactéries d'un culot bactérien obtenu après centrifugation (4000 g pendant 10 min à 4°C) d'une culture exponentielle (entre 0,4 et 0,6 unité d'absorbance à 600 nm) ont été remises en suspension dans $2/5^{\text{ème}}$ de volume (par rapport au volume initial de culture) de tampon TFB1 (acétate de potassium 30 mM, RbCl₂ 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, glycérol 15 % (v/v), pH 5,8) et incubées pendant 5 min à 0°C. Les cellules ont ensuite été collectées par centrifugation à 4000 g pendant 5 min à 4°C. Après 1 h d'incubation à 0°C dans $1/25^{\text{ème}}$ de volume de tampon TFB2 (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, RbCl₂ 10 mM, glycérol 15 % (v/v), pH 6,5), la suspension bactérienne a été répartie en aliquotes de 100 µL et conservées à -80°C.

Pour la transformation proprement dite, 100 µL de cellules compétentes ont été mis en contact avec le plasmide à transférer pendant 30 min dans la glace. Après un choc thermique de 1 min à 42°C suivi d'une période de 10 min dans la glace, les bactéries ont été cultivées pendant 1 h à 37°C sous agitation (225 rpm) dans 1 mL de bouillon MH puis transférées sur un milieu sélectif approprié.

7.2. Conjugaison bactérienne

Cinquante µL d'une culture de la nuit de la souche *E. coli* « helper » HB101 contenant le plasmide pRK2013 ont été mélangés à 50 µL de la souche de *E. coli* donneuse (CC118 contenant un plasmide mini-CTX1 recombinant ; CC118λ*pir* contenant un plasmide pKNG101 recombinant ; S17.1 contenant le vecteur pEXΔBrec), et déposés en goutte à la surface d'une gélose MH. Deux heures plus tard, 30 µL d'une culture de la nuit de la souche receveuse (*P. aeruginosa*) préalablement incubée sans agitation à 42°C ont été ajoutés au

dépôt initial. Après 4 h de conjugaison, le spot obtenu a été remis en suspension dans 1 mL de bouillon MH et placé sous agitation à 37°C pendant 1 h 30 min. Les transconjugants ont été sélectionnés sur un milieu sélectif approprié.

8. Délétion génique par PCR chevauchante et recombinaison homologue

Deux fragments d'environ 500 pb entourant le gène à déléter ont été amplifiés séparément par PCR à l'aide des amorces répertoriées dans le **Tableau 25**. Chaque fragment possède, à son extrémité la plus proche du gène cible, une séquence de 7 pb complémentaires à celle de l'autre fragment ajoutée par la PCR. Une seconde amplification par une PCR dite « chevauchante » a été réalisée en utilisant comme matrice une quantité équivalente d'ADN des amplicons obtenus précédemment. Le produit de cette PCR qui comprend les régions bordant le gène cible sur le chromosome a été cloné dans le vecteur PCR2.1-TOPO (Invitrogen), puis sous-cloné dans le vecteur pKNG101. Ce dernier se comporte comme un vecteur suicide chez *P. aeruginosa* puisqu'il possède une origine de réplication *oriR6K* fonctionnelle uniquement chez *E. coli*. Ce plasmide a été transféré chez la souche de *E. coli* CC118 λ pir (souche donneuse) par choc thermique, puis par conjugaison dans différentes souches de *P. aeruginosa* à l'aide du plasmide " helper " (pRK2013) présent dans la souche de *E. coli* HB101. Le milieu PAI additionné de streptomycine (2000 μ g/mL) a permis la sélection des transconjugants. L'excision du vecteur a ensuite été réalisée en cultivant ceux-ci sur un milieu minimum M9 contenant 5 % de saccharose (p/v). En effet, celui-ci contient le gène *sacB*, codant une lévane saccharase qui catalyse l'hydrolyse du saccharose en produit toxique pour la cellule. Les clones présentant un profil de résistance aux antibiotiques, compatible avec l'inactivation du gène cible, ont été conservés pour analyse. L'élimination du vecteur pKNG recombinant conduit théoriquement à deux types d'évènements, soit l'excision complète du plasmide et le retour à un phénotype sauvage, soit la délétion du gène cible. L'amplification et le séquençage de la région délétée ont permis de contrôler le retrait du gène en question chez les différents clones.

9. Complémentation chromosomique

L'opéron *parRS* des souches cliniques mutées dans le gène *parS* ainsi que celui de la souche sauvage PAO1 ont été amplifiés par PCR à l'aide des amorces répertoriées dans le

Tableau 25. Certains ont été sous-clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO avant d'être transférés dans le plasmide mini-CTX1 (*parRS*_{PAO1, 2946, 3136, 3562, 3726, 3728}). Pour d'autres, la présence de sites de restriction au sein du gène a nécessité le transfert direct dans le vecteur mini-CTX-1 (*parRS*_{2756, 2794}). Les plasmides recombinants ont ensuite été introduits dans des souches de *E. coli* CC118 par choc thermique puis par conjugaison dans la souche de *P. aeruginosa* CM096 (PAO1Δ*parRS*).

10. Quantification des ARNm par PCR en temps réel

10.1. Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

Une culture bactérienne de la nuit a été diluée au 1/100^{ème} dans du bouillon MH puis incubée sous une agitation constante à 37°C (+/- 0,5°C) pendant 4 h (1 unité d'absorbance à 600 nm). L'extraction des ARN totaux a été effectuée à l'aide du kit *Qiagen Rneasy® plus* (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. Les ARN obtenus ont été traités par une ADNase (Proméga) pendant 15 min afin d'éliminer toute trace de contamination par de l'ADN génomique.

La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir de 2 µg d'ARN total à l'aide des réactifs de transcription inverse (*ImProm-IITm reaction buffer*, *ImProm-IITm reverse transcriptase*, MgCl₂, Promega) et d'hexamères aléatoires utilisés comme amorces (*random primers*, Promega). Après une incubation de 50 min à 42°C, l'enzyme a été inactivée par 15 min de chauffage à 70°C. La réalisation d'un contrôle sans transcription inverse sur chaque extrait, nous a permis de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique. Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C.

10.2. Amplification des ADNc

Les appareils Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research, Sydney, Australie) et RG6000 (Qiagen) ont été utilisés pour les réactions d'amplification et de quantification de l'expression génique. Le milieu réactionnel comprenait 3 µL d'ADNc, 7,5 µL de *fast SYBR Green master mix* (*Rotor-Gene SYBR green PCR kit*, Qiagen) et 1,5 mM de chaque amorce (Erreur ! Source u renvoi introuvable.). Le volume total du mélange réactionnel a été ajusté à 15 µL avec de l'eau dépourvue d'ARNase (Proméga). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 95°C pendant 5 mn suivi de 40 cycles à 95°C (5 s), 60°C (10 s) et 72°C (20 s). L'acquisition

des informations s'est effectuée à chaque cycle au cours de la phase d'hybridation. Par ailleurs, chaque série a comporté un témoin sans transcription inverse, un contrôle négatif et une gamme de dilution ($1/10^{\text{ème}}$, $1/100^{\text{ème}}$ et $1/1000^{\text{ème}}$) préparée à partir de la souche de référence PAO1. L'expression des gènes a été quantifiée par comparaison avec la courbe d'étalonnage. Après la réaction d'amplification, une courbe de fusion a été établie afin de vérifier la spécificité des produits amplifiés, l'absence de formation d'éventuels dimères d'amorces et/ou de contaminants.

10.3. Quantification relative des transcrits des gènes

Les niveaux d'expression génique ont été estimés selon la méthode décrite par Pfaffl *et al.* (Pfaffl *et al.*, 2002) par comparaison avec un standard interne, le gène de ménage *rpsL* codant une protéine ribosomale dont l'expression est supposée constante pendant la phase exponentielle de croissance. Cette méthode de quantification tient compte de l'efficacité (E) d'amplification du gène étudié ($E_{\text{gène intérêt}}$) et du gène standard *rpsL* (E_{rpsL}), ainsi que des valeurs de CT (Cycle Threshold) obtenues pour la souche étudiée (CT_{rpsL} de l'échantillon et $CT_{\text{gène d'intérêt}}$ de l'échantillon) et pour la souche de référence PAO1 (CT_{rpsL} de PAO1 et $CT_{\text{gène d'intérêt}}$ de PAO1). La constante CT correspond au premier cycle où une augmentation significative de l'intensité de fluorescence, correspondant au produit amplifié, est observée. La quantification de l'expression génique a été calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{gène intérêt}})^{\Delta CT_{\text{gène d'intérêt}} (\text{PAO1-échantillon})}}{(E_{rpsL})^{\Delta CT_{rpsL} (\text{PAO1-échantillon})}} \quad \text{Efficacité (E)} = 10^{(-1/\text{pente})}$$

La pente est celle de la droite construite avec les valeurs de la souche PAO1 aux dilutions $1/10^{\text{ème}}$, $1/100^{\text{ème}}$, et $1/1000^{\text{ème}}$. Au final, les résultats obtenus avec les souches d'intérêt ont été comparés à ceux de PAO1. Les valeurs d'expression génique relative présentées dans la partie « Résultats » correspondent à des valeurs moyennes obtenues à partir de deux ou trois extractions d'ARNm indépendantes.

11. Recherche d'un gène « oprM like »

Elle a consisté à amplifier la région située entre le gène *mexY* et le gène *PA2018* afin de détecter la présence éventuelle du gène *oprA* comme chez la souche PA7. Après une PCR

utilisant les amorces décrites dans le **Tableau 25** puis une migration électrophorétique sur gel d'agarose, la taille des amplicons a été déterminée (395 pb et 1570 pb pour des souches *oprA* négatives et positives, respectivement).

C. Génomique

1. Puces à ADN

Les puces Clondiag® « *P. aeruginosa* » (Alère) permettent le génotypage et le pathotypage rapide des souches cliniques grâce à une technique basée sur une hybridation spécifique entre l'ADN génomique d'une souche marqué à la biotine et de courtes sondes nucléotidiques (15-20 nucléotides) greffées sur les puces. En une seule manipulation, on peut ainsi détecter 32 SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) et la présence potentielle de 45 déterminants de virulence (**Figure 50**). Le génotypage par cette méthode prend uniquement en compte la partie conservée du génome (*core genome*). La partie variable ou génome « accessoire » peut être analysée dans un second temps pour affiner l'étude de la clonalité des isolats.

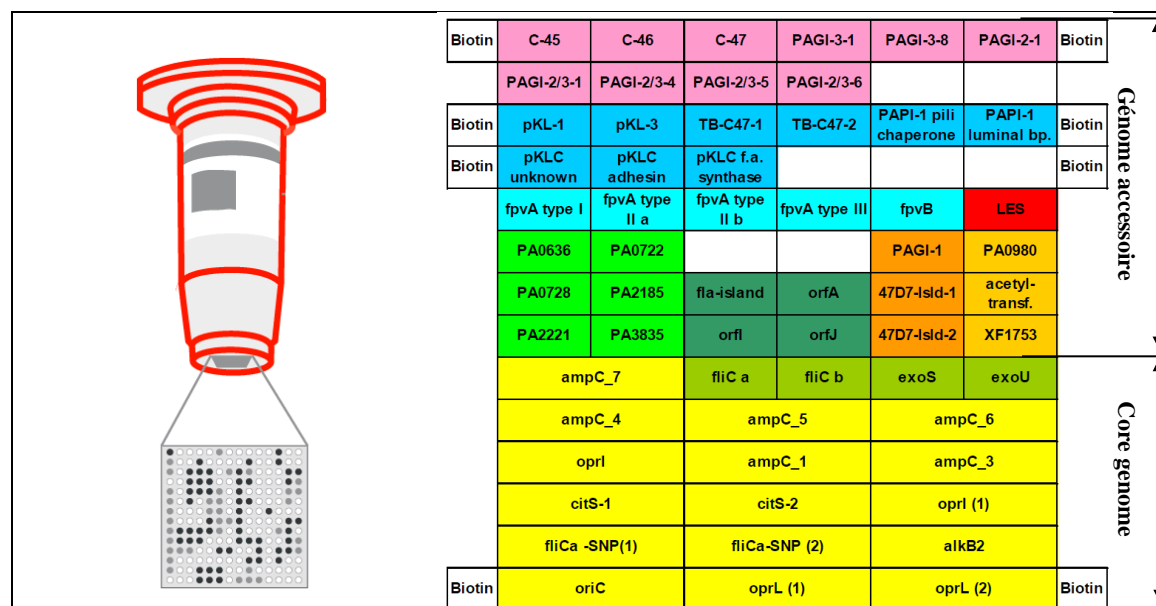


Figure 50. Disposition et identification des sondes et témoins positifs (biotine) greffés sur la puce « *P. aeruginosa* ».

La réaction de PCR ainsi que les différentes étapes d'hybridation et de révélation de la puce ont été réalisées à l'aide du kit « *P. aeruginosa* Genotyping Kit » selon les recommandations du fournisseur (Alere). Après acquisition des images d'hybridation à l'aide d'un lecteur spécifique, les SNP ont été analysés et un code hexadécimal attribué à chaque souche. Ainsi 2 souches présentant le même code hexadécimal ont été considérées comme clonales.

2. MLVA

Cette technique d'analyse génétique par PCR décrite par Vu-Thien *et al.* exploite comme source de polymorphisme la variation du nombre de motifs dans des répétitions en tandem (VNTR : *Variable Number of Tandem Repeats*) (Vu-Thien *et al.*, 2007) (**Figure 51**). Les souches de référence PAO1 et PA14 sont utilisées comme contrôles de la stabilité des marqueurs. Treize des 15 couples d'amorces décrits par Vu-Thien *et al.* ont été utilisés dans ce travail **Tableau 26**. Le mélange réactionnel utilisé pour les amplifications est identique à celui décrit dans le paragraphe B.2. Les fragments amplifiés sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose 2% (p/v). La taille de chaque amplicon a été établie à l'aide du logiciel Quantity One (version 4.6.5 – Bio-Rad) et le nombre de répétitions de chaque motif déterminé en utilisant la souche PAO1 en référence. Les isolats présentant plus de 80% d'identité pour les treize marqueurs étudiés ont été considérées comme génétiquement proches.

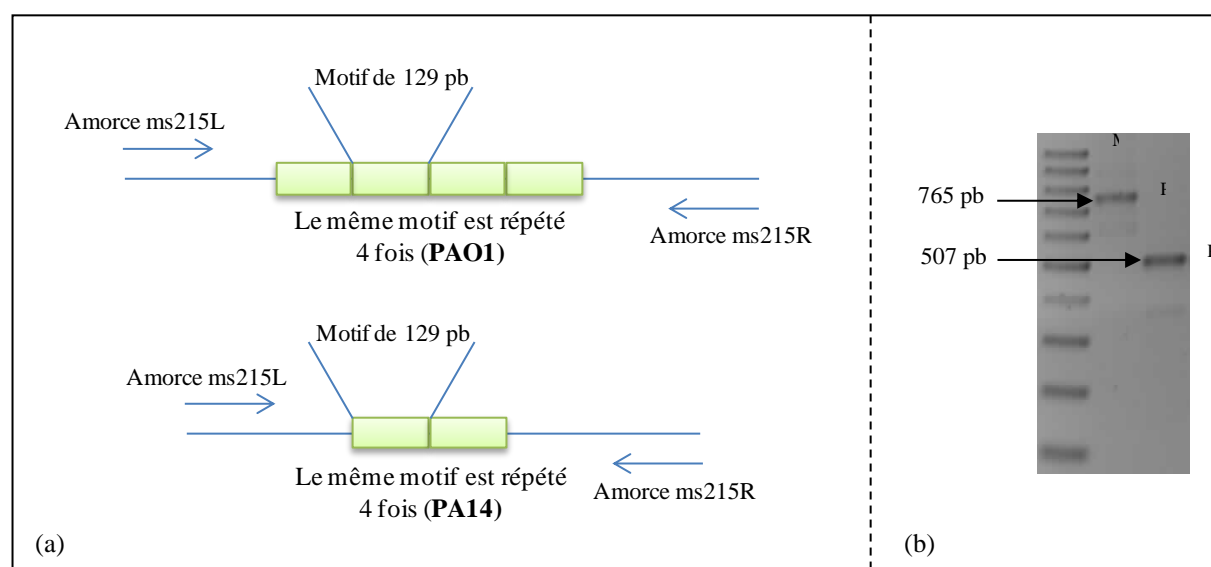


Figure 51. Exemple d'amplification du locus 215 chez les souches de *P. aeruginosa* PAO1 et PA14.

(a) structure du VNTR sur le locus chez PAO1 et PA14. (b) profils de migration des fragments amplifiés chez les souches PAO1 et PA14 pour le locus ms215. M : marqueur de taille.

Tableau 26. Couples d'amorces utilisés pour le génotypage par MLVA (Vu-Thien *et al.*, 2007).

Nom du locus	Taille de la répétition (pb)	Taille (pb)*		Amorces	Séquences nucléotidiques (5' - 3')
		PAO1	PA14		
ms77	39	442 (4)	364 (2)	ms77L	GCGTCATGGTCTGCATGTC
				ms77R	TATACCCTCTTCGCCCAGTC
ms127	15	210 (8)	225 (9)	ms127L	CTCGGAGTCTCTGCCAACTC
				ms127R	GGCAGGACAGGATCTCGAC
ms142	115	890 (7)	201 (1)	ms142L	AGCAGTGCCAGTTGATGTTG
				ms142R	GTGGGGCGAAGGAGTGAG
ms172	54	789 (12)	789 (12)	ms172L	GGATTCTCTCGCACGAGGT
				ms172R	TACGTGACCTGACGTTGGTG
ms211	101	663 (5)	360 (2)	ms211L	ACAAGCGCCAGCCGAACCTGT
				ms211R	CTTCGAACAGGTGCTGACCGC
ms212	40	522 (9)	324 (4)	ms212L	TGCTGGTCGACTACTTCGGCAA
				ms212R	ACTACGAGAACGACCCGGTGTT
ms213	103	640 (5)	221 (1)	ms213L	CTGGGCAAGTGTTGGTGGATC
				ms213R	TGGCGTACTCCGAGCTGATG
ms214	115	426 (3)	655 (5)	ms214L	AAACGCTGTTTCGCCAACCTCTA
				ms214R	CCATCATCCTCCTACTGGGTT
ms215	129	765 (4)	507 (2)	ms215L	GACGAAACCCGTCGCGAACA
				ms215R	CTGTACAACGCCGAGCCGTA
ms216	113	543 (3)	315 (1)	ms216L	ACTACTACGTCGAACACGCCA
				ms216R	GATCGAAGACAAGAACCCTCG
ms217	109	606 (2)	933 (5)	ms217L	TTCTGGCTGTCGCGACTGAT
				ms217R	GAACAGCGTCTTTTCCTCGC
ms222	101	390 (2)	391 (2)	ms222L	AGAGGTGCTTAACGACGGAT
				ms222R	TGCAGTTCTGCGAGGAAGGCG
ms223	106	454 (4)	453 (4)	ms223L	TTGGCAATATGCCGGTTCGC
				ms223R	TGAGCTGATCGCCTACTGG

* le nombre de répétitions du motif figure entre parenthèse après la taille du fragment amplifié.

Tableau 27. Abréviations utilisées pour les antibiotiques.

β-lactamines (βL)		Aminosides (AG)	Macrolides (ML)	Quinolones (QL)	Tétracyclines (TC)	Autres
<u>Inhibiteurs de β-lactamases</u>	CPO : céfpirome	AMK : amikacine	AZM : azithromycine	CFN : clinafloxacin	DOX : doxycycline	CHL : chloramphénicol
CLA : acide clavulanique	CRO : cefuroxime	APR : apramycine	CET : céthromycine	CIP : ciprofloxacine	MIN : minocycline	CST : colistine
CLO : cloxacilline	CTR : ceftriaxone	FOR : fortimicine	CLI : clindamycine	ENX : énoxacine	TET : tétracycline	FOS : fosfomycine
<u>Pénicillines</u>	CTT : céfotétan	GEN : gentamicine	CLR : clarithromycine	GEM : gémifloxacine	TGC : tigécycline	PMB : polymyxine B
AMP : ampicilline	CTX : céfotaxime	ISP : iséпамicine	ERY : érythromycine	LVX : lévofloxacine		RIF : rifampicine
AMX : amoxicilline	FEP : céfépime	KAN : kanamycine		MXF : moxifloxacine		SMX : sulfaméthoxazole
CAR : carbénicilline	FMX : flomoxef	NEO : néomycine		NAL : acide nalidixique		TMP : triméthoprim
PEN : pénicilline	FOX : céfoxitine	NET : nétilmicine		NOR : norfloxacine		TMP/SMX : cotrimoxazole
PIP : pipéracilline	<u>Monobactames</u>	PAR : paromomycine		NOV : novobiocine		
TIC : ticarcilline	ATM : aztréonam	SPT : spectinomycine		OFX : ofloxacine		
<u>Céphalosporines</u>	MOX : moxalactam	STR : streptomycine		PEF : péfloxacine		
CAZ : ceftazidime	PIR : pirazmonam	TOB : tobramycine		SPX : sparfloxacine		
CEF : cefsulodin	TZP : tazobactam			TVA : trovafloxacine		
CEP : céphalotine	<u>Carbapénèmes</u>					
CFM : céfixime	DOR : doripénème					
CFP : céfopérazone	IPM : imipénème					
CMO : cefmatazole	MEM : méropénème					
CPD : cefpodoxime	PAN : panipénème					
CPL : céphaloridine						

Références

- Aagaard, C., and Douthwaite, S. (1994). Requirement for a conserved, tertiary interaction in the core of 23S ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2989-2993.
- Abouzeed, Y. M., Baucheron, S., and Cloeckert, A. (2008). *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2428-2434.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* **301**, 610-615.
- Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., and Baysse, C. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* **148**, 2371-2381.
- Aires, J. R., Kohler, T., Nikaido, H., and Plesiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2624-2628.
- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A., and Nakae, T. (2004). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **279**, 25939-25942.
- Akiba, M., Lin, J., Barton, Y. W., and Zhang, Q. (2006). Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother* **57**, 52-60.
- Akira inoue, K. H. (1989). A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* **338**, 264 - 266.
- Al-Aloul, M., Crawley, J., Winstanley, C., Hart, C. A., Ledson, M. J., and Walshaw, M. J. (2004). Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax* **59**, 334-336.
- Al-Hamad, A., Upton, M., and Burnie, J. (2009). Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* **64**, 731-734.
- Alonso, A., and Martinez, J. L. (1997). Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1140-1142.
- Alonso, A., and Martinez, J. L. (2000). Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3079-3086.
- Alonso, A., and Martinez, J. L. (2001). Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1879-1881.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (2000). Current protocols in molecular biology. New York, N.Y, John Wiley & Sons, Inc.
- Bador, J., Amoureux, L., Blanc, E., and Neuwirth, C. (2013). The innate aminoglycoside resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to AxyXY-OprZ, an RND-Type Multidrug Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Bador, J., Amoureux, L., Duez, J. M., Drabowicz, A., Siebor, E., Llanes, C., and Neuwirth, C. (2011). First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 4912-4914.
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Merighi, M., Smith, R., Narasimhan, G., Lory, S., and Mathee, K. (2012). The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC ss-lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One* **7**, e34067.
- Ballarini, A., Scalet, G., Kos, M., Cramer, N., Wiehlmann, L., and Jousson, O. (2012). Molecular typing and epidemiological investigation of clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* using an oligonucleotide-microarray. *BMC Microbiol* **12**, 152.
- Baum, E. Z., Crespo-Carbone, S. M., Morrow, B. J., Davies, T. A., Foleno, B. D., He, W., Queenan, A. M., and Bush, K. (2009). Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2785-2790.
- Bazzini, S., Udine, C., Sass, A., Pasca, M. R., Longo, F., Emiliani, G., Fondi, M., Perrin, E., Decorosi, F., Viti, C., Giovannetti, L., Leoni, L., Fani, R., Riccardi, G., Mahenthiralingam, E., and Buroni, S. (2011). Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*. *PLoS One* **6**, e18902.
- Begic, S., and Worobec, E. A. (2008). The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. *Microbiology* **154**, 454-461.
- Begum, A., Rahman, M. M., Ogawa, W., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2005). Gene cloning and characterization of four MATE family multidrug efflux pumps from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiol Immunol* **49**, 949-957.
- Berg, G., Roskot, N., and Smalla, K. (1999). Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* **37**, 3594-3600.

- Berka, R. M., Gray, G. L., and Vasil, M. L. (1981). Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **34**, 1071-1074.
- Bialek-Davenet, S., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Lavigne, J. P., Bert, F., Moreau, R., and Nicolas-Chanoine, M. H. (2011). In vitro selection of *ramR* and *soxR* mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2795-2802.
- Bina, J. E., Provenzano, D., Wang, C., Bina, X. R., and Mekalanos, J. J. (2006). Characterization of the *Vibrio cholerae* *vexAB* and *vexCD* efflux systems. *Arch Microbiol* **186**, 171-181.
- Biot, F. V., Valade, E., Garnotel, E., Chevalier, J., Villard, C., Thibault, F. M., Vidal, D. R., and Pages, J. M. (2011). Involvement of the efflux pumps in chloramphenicol selected strains of *Burkholderia thailandensis*: proteomic and mechanistic evidence. *PLoS One* **6**, e16892.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Jakobsen, T. H., Phipps, R., Nielsen, A. K., Rybtke, M. T., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Hoiby, N., and Ciofu, O. (2010). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One* **5**, e10115.
- Bouvet, P. J., and Grimont, P. A. (1987). Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**, 569-578.
- Braibant, M., Guilloteau, L., and Zygmunt, M. S. (2002). Functional characterization of *Brucella melitensis* NorMI, an efflux pump belonging to the multidrug and toxic compound extrusion family. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3050-3053.
- Bratu, S., Landman, D., Martin, D. A., Georgescu, C., and Quale, J. (2008). Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2999-3005.
- Bromberg, Y., and Rost, B. (2007). SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res* **35**, 3823-3835.
- Buroni, S., Pasca, M. R., Flannagan, R. S., Bazzini, S., Milano, A., Bertani, I., Venturi, V., Valvano, M. A., and Riccardi, G. (2009). Assessment of three Resistance-Nodulation-Cell Division drug efflux transporters of *Burkholderia cenocepacia* in intrinsic antibiotic resistance. *BMC Microbiol* **9**, 200.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., and O'Gara, F. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* **152**, 405-418.
- Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Dominguez, M. A., Gago, J. F., Juan, C., Tubau, F., Rodriguez, C., Moya, B., Pena, C., Martinez-Martinez, L., and Oliver, A. (2012). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 6349-6357.
- Campo Esquisabel, A. B., Rodriguez, M. C., Campo-Sosa, A. O., Rodriguez, C., and Martinez-Martinez, L. (2011). Mechanisms of resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* less susceptible to cefepime than to ceftazidime. *Clin Microbiol Infect* **17**, 1817-1822.
- Cao, L., Srikumar, R., and Poole, K. (2004). MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol Microbiol* **53**, 1423-1436.
- CA-SFM (2010). *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*.
- Castang, S., McManus, H. R., Turner, K. H., and Dove, S. L. (2008). H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18947-18952.
- Caughlan, R. E., Sriram, S., Daigle, D. M., Woods, A. L., Bucu, J., Peterson, R. L., Dzink-Fox, J., Walker, S., and Dean, C. R. (2009). Fmt bypass in *Pseudomonas aeruginosa* causes induction of MexXY efflux pump expression. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 5015-5021.
- Chan, Y. Y., Tan, T. M., Ong, Y. M., and Chua, K. L. (2004). BpeAB-OprB, a multidrug efflux pump in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1128-1135.
- Chang, G. (2003). Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Lett* **555**, 102-105.
- Chang, L. L., Chen, H. F., Chang, C. Y., Lee, T. M., and Wu, W. J. (2004). Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* **53**, 518-521.
- Chau, S. L., Chu, Y. W., and Houang, E. T. (2004). Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4054-4055.
- Chen, C. H., Huang, C. C., Chung, T. C., Hu, R. M., Huang, Y. W., and Yang, T. C. (2011). Contribution of resistance-nodulation-division efflux pump operon *smeU1-V-W-U2-X* to multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 5826-5833.
- Chen, H., Yi, C., Zhang, J., Zhang, W., Ge, Z., Yang, C. G., and He, C. (2010). Structural insight into the oxidation-sensing mechanism of the antibiotic resistance of regulator MexR. *EMBO Rep* **11**, 685-690.
- Chen, Y. J., Pornillos, O., Lieu, S., Ma, C., Chen, A. P., and Chang, G. (2007). X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18999-19004.

- Chiu, C. H., Lee, H. Y., Tseng, L. Y., Chen, C. L., Chia, J. H., Su, L. H., and Liu, S. Y. (2010). Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipenem in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* **35**, 382-386.
- Cho, H. H., Sung, J. Y., Kwon, K. C., and Koo, S. H. (2012). Expression of Sme efflux pumps and multilocus sequence typing in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Ann Lab Med* **32**, 38-43.
- Choi, K. H., Mima, T., Casart, Y., Rholl, D., Kumar, A., Beacham, I. R., and Schweizer, H. P. (2008). Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1064-1075.
- Chu, Y. W., Chau, S. L., and Houang, E. T. (2006). Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups. *J Med Microbiol* **55**, 477-478.
- Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N., and Schweizer, H. P. (2005). Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2133-2136.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T., and Schweizer, H. P. (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol* **184**, 5036-5044.
- Chuanchuen, R., Wannaprasat, W., and Schweizer, H. P. (2008). Functional characterization of MexXY and OpmG in aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **39**, 115-122.
- Coyne, S., Courvalin, P., and Perichon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 947-953.
- Coyne, S., Guigon, G., Courvalin, P., and Perichon, B. (2010a). Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 333-340.
- Coyne, S., Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P., and Perichon, B. (2010b). Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 4389-4393.
- Crossman, L. C., Gould, V. C., Dow, J. M., Vernikos, G. S., Okazaki, A., Sebahia, M., Saunders, D., Arrowsmith, C., Carver, T., Peters, N., Adlem, E., Kerhornou, A., Lord, A., Murphy, L., Seeger, K., Squares, R., Rutter, S., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Harris, D., Churcher, C., Bentley, S. D., Parkhill, J., Thomson, N. R., and Avison, M. B. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* **9**, R74.
- Cruden, D. L., Wolfram, J. H., Rogers, R. D., and Gibson, D. T. (1992). Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2723-2729.
- Currie, B. J., Dance, D. A., and Cheng, A. C. (2008). The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102 Suppl 1**, S1-4.
- Dalvi, S. D., and Worobec, E. A. (2012). Gene expression analysis of the SdeAB multidrug efflux pump in antibiotic-resistant clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Indian J Med Microbiol* **30**, 302-307.
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Bremont, S., Lambert, T., and Courvalin, P. (2008). AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 557-562.
- De Baets, F., Schelstraete, P., Van Daele, S., Haerynck, F., and Vaneechoutte, M. (2007). *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J Cyst Fibros* **6**, 75-78.
- Deziel, E., Comeau, Y., and Villemur, R. (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* **183**, 1195-1204.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P., and Camara, M. (2002). Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**, 2576-2586.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7347-7351.
- Dotsch, A., Becker, T., Pommerenke, C., Magnowska, Z., Jansch, L., and Haussler, S. (2009). Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2522-2531.
- Dumas, J. L., van Delden, C., Perron, K., and Kohler, T. (2006). Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* **254**, 217-225.

- Dupont, P., Hocquet, D., Jeannot, K., Chavanet, P., and Plesiat, P. (2005). Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **55**, 518-522.
- El'Garch, F., Jeannot, K., Hocquet, D., Llanes-Barakat, C., and Plesiat, P. (2007). Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1016-1021.
- Engel, J., and Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* **12**, 61-66.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., and Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* **172**, 884-900.
- Evans, K., Adewoye, L., and Poole, K. (2001). MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J Bacteriol* **183**, 807-812.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., and Poole, K. (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**, 5443-5447.
- Fange, D., Nilsson, K., Tenson, T., and Ehrenberg, M. (2009). Drug efflux pump deficiency and drug target resistance masking in growing bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8215-8220.
- Farris, C., Sanowar, S., Bader, M. W., Pfuetzner, R., and Miller, S. I. (2010). Antimicrobial peptides activate the Rcs regulon through the outer membrane lipoprotein RcsF. *J Bacteriol* **192**, 4894-4903.
- Feliziani, S., Lujan, A. M., Moyano, A. J., Sola, C., Bocco, J. L., Montanaro, P., Canigia, L. F., Argarana, C. E., and Smania, A. M. (2010). Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS One* **5**.
- Fernandez, L., Gooderham, W. J., Bains, M., McPhee, J. B., Wiegand, I., and Hancock, R. E. (2010). Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3372-3382.
- Fernandez, L., Jenssen, H., Bains, M., Wiegand, I., Gooderham, W. J., and Hancock, R. E. (2012a). The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 6212-6222.
- Fernandez, M., Conde, S., de la Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J. L., and Duque, E. (2012b). Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1001-1009.
- Fluman, N., Ryan, C. M., Whitelegge, J. P., and Bibi, E. (2012). Dissection of mechanistic principles of a secondary multidrug efflux protein. *Mol Cell* **47**, 777-787.
- Fournier, D., Richardot, C., Muller, E., Robert-Nicoud, M., Llanes, C., Plesiat, P., and Jeannot, K. (2013). Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*.
- Fournier, P. E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poiriel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., and Claverie, J. M. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* **2**, e7.
- Fraud, S., Campigotto, A. J., Chen, Z., and Poole, K. (2008). MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 4478-4482.
- Fukumori, F., Hirayama, H., Takami, H., Inoue, A., and Horikoshi, K. (1998). Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent resistance. *Extremophiles* **2**, 395-400.
- Gao, R., and Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**, 133-154.
- German, N., Wei, P., Kaatz, G. W., and Kerns, R. J. (2008). Synthesis and evaluation of fluoroquinolone derivatives as substrate-based inhibitors of bacterial efflux pumps. *Eur J Med Chem* **43**, 2453-2463.
- Ghisalberti, D., Masi, M., Pages, J. M., and Chevalier, J. (2005). Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 1113-1118.
- Ghosh, S., Cremers, C. M., Jakob, U., and Love, N. G. (2011). Chlorinated phenols control the expression of the multidrug resistance efflux pump MexAB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* by interacting with NalC. *Mol Microbiol* **79**, 1547-1556.
- Gibbons, S., Oluwatuyi, M., and Kaatz, G. W. (2003). A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **51**, 13-17.

- Giske, C. G., Boren, C., Wretling, B., and Kronvall, G. (2005). Meropenem susceptibility breakpoint for *Pseudomonas aeruginosa* strains hyperproducing *mexB* mRNA. *Clin Microbiol Infect* **11**, 662-669.
- Giwerzman, B., Meyer, C., Lambert, P. A., Reinert, C., and Hoiby, N. (1992). High-level beta-lactamase activity in sputum samples from cystic fibrosis patients during antipseudomonal treatment. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 71-76.
- Goldberg, J. B., Hancock, R. E., Parales, R. E., Loper, J., and Cornelis, P. (2008). *Pseudomonas* 2007. *J Bacteriol* **190**, 2649-2662.
- Goss, C. H., Mayer-Hamblett, N., Aitken, M. L., Rubenfeld, G. D., and Ramsey, B. W. (2004). Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax* **59**, 955-959.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, M., and Nishino, T. (1998). Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in Delta *mexA-mexB-oprM* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1938-1943.
- Gould, V. C., and Avison, M. B. (2006). SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships. *J Antimicrob Chemother* **57**, 1070-1076.
- Gould, V. C., Okazaki, A., and Avison, M. B. (2006). Beta-lactam resistance and beta-lactamase expression in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates having defined phylogenetic relationships. *J Antimicrob Chemother* **57**, 199-203.
- Gould, V. C., Okazaki, A., Howe, R. A., and Avison, M. B. (2004). Analysis of sequence variation among *smeDEF* multi drug efflux pump genes and flanking DNA from defined 16S rRNA subgroups of clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *J Antimicrob Chemother* **54**, 348-353.
- Govan, J. R., and Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**, 539-574.
- Guglierame, P., Pasca, M. R., De Rossi, E., Buroni, S., Arrigo, P., Manina, G., and Riccardi, G. (2006). Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiol* **6**, 66.
- Hadjiliadis, D., Steele, M. P., Chaparro, C., Singer, L. G., Waddell, T. K., Hutcheon, M. A., Davis, R. D., Tullis, D. E., Palmer, S. M., and Keshavjee, S. (2007). Survival of lung transplant patients with cystic fibrosis harboring panresistant bacteria other than *Burkholderia cepacia*, compared with patients harboring sensitive bacteria. *J Heart Lung Transplant* **26**, 834-838.
- Hamad, M. A., Skeldon, A. M., and Valvano, M. A. (2010). Construction of aminoglycoside-sensitive *Burkholderia cenocepacia* strains for use in studies of intracellular bacteria with the gentamicin protection assay. *Appl Environ Microbiol* **76**, 3170-3176.
- Hammami, S., Ghazzi, R., Burghoffer, B., Arlet, G., and Redjeb, S. (2009). Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathol Biol (Paris)* **57**, 530-535.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hancock, R. E. (1981). Aminoglycoside uptake and mode of action-with special reference to streptomycin and gentamicin. II. Effects of aminoglycosides on cells. *J Antimicrob Chemother* **8**, 429-445.
- Harms, J., Schlutzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic *eubacterium*. *Cell* **107**, 679-688.
- Hay, T., Fraud, S., Lau, C. H., Gilmour, C., and Poole, K. (2013). Antibiotic inducibility of the *mexXY* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the MexZ anti-repressor ArmZ. *PLoS One* **8**, e56858.
- Hayashi, M., Tabata, K., Yagasaki, M., and Yonetani, Y. (2010). Effect of multidrug-efflux transporter genes on dipeptide resistance and overproduction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **304**, 12-19.
- Hayden, H. S., Lim, R., Brittnacher, M. J., Sims, E. H., Ramage, E. R., Fong, C., Wu, Z., Crist, E., Chang, J., Zhou, Y., Radey, M., Rohmer, L., Haugen, E., Gillett, W., Wuthiekanun, V., Peacock, S. J., Kaul, R., Miller, S. I., Manoil, C., and Jacobs, M. A. (2012). Evolution of *Burkholderia pseudomallei* in recurrent melioidosis. *PLoS One* **7**, e36507.
- He, G. X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2004). An H(+)-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**, 262-265.
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W., and Wiedemann, B. (2007). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 4062-4070.
- Hernould, M., Gagne, S., Fournier, M., Quentin, C., and Arpin, C. (2008). Role of the AheABC efflux pump in *Aeromonas hydrophila* intrinsic multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1559-1563.

- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**, 6557-6567.
- Higgins, C. F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* **152**, 205-210.
- Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R. E., and Speert, D. P. (2002). Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med* **196**, 109-118.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J., and Schweizer, H. P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**, 77-86.
- Hoang, T. T., Kutchma, A. J., Becher, A., and Schweizer, H. P. (2000). Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* **43**, 59-72.
- Hocquet, D., Muller, A., Blanc, K., Plesiat, P., Talon, D., Monnet, D. L., and Bertrand, X. (2008). Relationship between antibiotic use and incidence of MexXY-OprM overproducers among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1173-1175.
- Hocquet, D., Nordmann, P., El Garch, F., Cabanne, L., and Plesiat, P. (2006). Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1347-1351.
- Hocquet, D., Roussel-Delvallez, M., Cavallo, J. D., and Plesiat, P. (2007). MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1582-1583.
- Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskaya, O., and Plesiat, P. (2003). MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1371-1375.
- Hood, M. I., Jacobs, A. C., Sayood, K., Dunman, P. M., and Skaar, E. P. (2010). *Acinetobacter baumannii* increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 1029-1041.
- Hornsey, M., Ellington, M. J., Doumith, M., Hudson, S., Livermore, D. M., and Woodford, N. (2010a). Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiofime. *J Antimicrob Chemother* **65**, 479-482.
- Hornsey, M., Ellington, M. J., Doumith, M., Scott, G., Livermore, D. M., and Woodford, N. (2010b). Emergence of AcrAB-mediated tigecycline resistance in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* during ciprofloxacin treatment. *Int J Antimicrob Agents* **35**, 478-481.
- Huda, M. N., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2001). Na⁺-driven multidrug efflux pump VcmA from *Vibrio cholerae* non-O1, a non-halophilic bacterium. *FEMS Microbiol Lett* **203**, 235-239.
- Huda, N., Lee, E. W., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003). Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcmA, in Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2413-2417.
- Huys, G., Cnockaert, M., Nemec, A., and Swings, J. (2005). Sequence-based typing of *adeB* as a potential tool to identify intraspecific groups among clinical strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **43**, 5327-5331.
- Ikonomidis, A., Tsakris, A., Kantzanou, M., Spanakis, N., Maniatis, A. N., and Pournaras, S. (2008). Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **279**, 36-39.
- Inka Siegmund, F. W. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques* **5**, 265-268.
- Islam, S., Jalal, S., and Wretling, B. (2004). Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* **10**, 877-883.
- Izaki, K., and Arima, K. (1963). Disappearance of oxytetracycline accumulation in the cells of multiple drug-resistant *Escherichia Coli*. *Nature* **200**, 384-385.
- Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N., and Wretling, B. (2000). Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 710-712.
- Jeannot, K., Elsen, S., Kohler, T., Attree, I., van Delden, C., and Plesiat, P. (2008). Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2455-2462.

- Jeannot, K., Sobel, M. L., El Garch, F., Poole, K., and Plesiat, P. (2005). Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol* **187**, 5341-5346.
- Jo, J. T., Brinkman, F. S., and Hancock, R. E. (2003). Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1101-1111.
- Kaniga, K., Delor, I., and Cornelis, G. R. (1991). A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**, 137-141.
- Kieboom, J., and de Bont, J. (2001). Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiology* **147**, 43-51.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., and Pechere, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**, 5990-5996.
- Kohler, T., Epp, S. F., Curty, L. K., and Pechere, J. C. (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 6300-6305.
- Kohler, T., Kok, M., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P., Gotoh, N., Nishino, T., Curty, L. K., and Pechere, J. C. (1996). Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2288-2290.
- Kohler, T., Michea-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K., and Pechere, J. C. (1997a). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **23**, 345-354.
- Kohler, T., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P., Kahr, A. L., and Pechere, J. C. (1997b). Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2540-2543.
- Kugelberg, E., Lofmark, S., Wretling, B., and Andersson, D. I. (2005). Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **55**, 22-30.
- Kulasekara, H. D., Ventre, I., Kulasekara, B. R., Lazdunski, A., Filloux, A., and Lory, S. (2005). A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial *cup* genes. *Mol Microbiol* **55**, 368-380.
- Kumar, A., Chua, K. L., and Schweizer, H. P. (2006). Method for regulated expression of single-copy efflux pump genes in a surrogate *Pseudomonas aeruginosa* strain: identification of the BpeEF-OprC chloramphenicol and trimethoprim efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3460-3463.
- Kumar, A., Mayo, M., Trunck, L. A., Cheng, A. C., Currie, B. J., and Schweizer, H. P. (2008). Expression of resistance-nodulation-cell-division efflux pumps in commonly used *Burkholderia pseudomallei* strains and clinical isolates from northern Australia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102 Suppl 1**, S145-151.
- Kumar, A., and Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 1486-1513.
- Kumar, A., and Schweizer, H. P. (2011). Evidence of MexT-independent overexpression of MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in presence of metabolic stress. *PLoS One* **6**, e26520.
- Kumita, W., Saito, R., Sato, K., Ode, T., Moriya, K., Koike, K., Chida, T., and Okamura, N. (2009). Molecular characterizations of carbapenem and ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas putida*. *J Infect Chemother* **15**, 6-12.
- Lacks, S., and Greenberg, B. (1977). Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J Mol Biol* **114**, 153-168.
- Lau, C. H., Fraud, S., Jones, M., Peterson, S. N., and Poole, K. (2012). Reduced expression of the *rplU-rpmA* ribosomal protein operon in *mexXY*-expressing pan-aminoglycoside-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 5171-5179.
- Li, X. Z., and Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* **69**, 1555-1623.
- Li, X. Z., Nikaido, H., and Poole, K. (1995). Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1948-1953.
- Li, X. Z., and Poole, K. (1999). Organic solvent-tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* display multiple antibiotic resistance. *Can J Microbiol* **45**, 18-22.
- Li, X. Z., Poole, K., and Nikaido, H. (2003a). Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 27-33.
- Li, X. Z., Zhang, L., and Poole, K. (1998a). Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J Bacteriol* **180**, 2987-2991.
- Li, X. Z., Zhang, L., and Poole, K. (2002). SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 333-343.

- Li, X. Z., Zhang, L., Srikumar, R., and Poole, K. (1998b). Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 399-403.
- Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003b). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **52**, 572-575.
- Liaw, S. J., Lee, Y. L., and Hsueh, P. R. (2010). Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* **35**, 126-130.
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T., and Ausubel, F. M. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2833-2838.
- Linares, J. F., Lopez, J. A., Camafeita, E., Albar, J. P., Rojo, F., and Martinez, J. L. (2005). Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 1384-1391.
- Linton, K. J. (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* **22**, 122-130.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., and Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* **22**, 582-610.
- Livermore, D. M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**, 557-584.
- Livermore, D. M., and Tulkens, P. M. (2009). Temocillin revived. *J Antimicrob Chemother* **63**, 243-245.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., and Plesiat, P. (2004). Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1797-1802.
- Llanes, C., Kohler, T., Patry, I., Dehecq, B., van Delden, C., and Plesiat, P. (2011). Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 5676-5684.
- Loh, B., Grant, C., and Hancock, R. E. (1984). Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **26**, 546-551.
- Lu, M., Symersky, J., Radchenko, M., Koide, A., Guo, Y., Nie, R., and Koide, S. (2013). Structures of a Na⁺-coupled, substrate-bound MATE multidrug transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2099-2104.
- Lubelski, J., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (2007). Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 463-476.
- Lynch, J. P., 3rd (2009). *Burkholderia cepacia* complex: impact on the cystic fibrosis lung lesion. *Semin Respir Crit Care Med* **30**, 596-610.
- Magnet, S., Courvalin, P., and Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3375-3380.
- Manchanda, V., Sanchaita, S., and Singh, N. (2010). Multidrug resistant *Acinetobacter*. *J Glob Infect Dis* **2**, 291-304.
- Manoil, C., and Beckwith, J. (1985). Tnp ϕ A: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8129-8133.
- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., and Lambert, T. (2004). Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3298-3304.
- Martin, F. A., Posadas, D. M., Carrica, M. C., Cravero, S. L., O'Callaghan, D., and Zorreguieta, A. (2009). Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in *Brucella suis*. *J Bacteriol* **191**, 2530-2540.
- Martinez-Garcia, E., and de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **13**, 2702-2716.
- Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A., and Nakae, T. (2000). Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **192**, 107-112.
- Maseda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T., and Nomura, N. (2004). Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-oprN efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1320-1328.
- Masi, M., Saint, N., Molle, G., and Pages, J. M. (2007). The *Enterobacter aerogenes* outer membrane efflux proteins TolC and EefC have different channel properties. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 2559-2567.

- Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S., and Nishino, T. (1999). Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 400-402.
- Masuda, N., Gotoh, N., Ohya, S., and Nishino, T. (1996). Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 909-913.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., and Nishino, T. (2001). Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa* *nfxB* mutant to beta-lactams due to reduced expression of the *ampC* beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1284-1286.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. (2000). Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2242-2246.
- Matsuo, Y., Eda, S., Gotoh, N., Yoshihara, E., and Nakae, T. (2004). MexZ-mediated regulation of *mexXY* multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the *mexZ-mexX* intergenic DNA. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 23-28.
- McLaughlin, H. P., Caly, D. L., McCarthy, Y., Ryan, R. P., and Dow, J. M. (2012). An orphan chemotaxis sensor regulates virulence and antibiotic tolerance in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **7**, e42205.
- McMurry, L., Petrucci, R. E., Jr., and Levy, S. B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 3974-3977.
- Miller, G. H., Sabatelli, F. J., Naples, L., Hare, R. S., Shaw, K. J., and *al., e.* (1994). Resistance to aminoglycosides in *Pseudomonas*. Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Trends Microbiol* **2**, 347-353.
- Mima, T., Kohira, N., Li, Y., Sekiya, H., Ogawa, W., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2009). Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **155**, 3509-3517.
- Mima, T., and Schweizer, H. P. (2010). The BpeAB-OprB efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b does not play a role in quorum sensing, virulence factor production, or extrusion of aminoglycosides but is a broad-spectrum drug efflux system. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3113-3120.
- Mima, T., Schweizer, H. P., and Xu, Z. Q. (2011). In vitro activity of cethromycin against *Burkholderia pseudomallei* and investigation of mechanism of resistance. *J Antimicrob Chemother* **66**, 73-78.
- Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol* **49**, 999-1002.
- Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (1999). Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 415-417.
- Miyamae, S., Nikaido, H., Tanaka, Y., and Yoshimura, F. (1998). Active efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2119-2121.
- Moore, R. A., DeShazer, D., Reckseidler, S., Weissman, A., and Woods, D. E. (1999). Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 465-470.
- Morita, Y., Cao, L., Gould, V. C., Avison, M. B., and Poole, K. (2006). *nalD* encodes a second repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 8649-8654.
- Morita, Y., Gilmour, C., Metcalf, D., and Poole, K. (2009). Translational control of the antibiotic inducibility of the PA5471 gene required for *mexXY* multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **191**, 4966-4975.
- Morita, Y., Kimura, N., Mima, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2001a). Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Gen Appl Microbiol* **47**, 27-32.
- Morita, Y., Komori, Y., Mima, T., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2001b). Construction of a series of mutants lacking all of the four major *mex* operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. *FEMS Microbiol Lett* **202**, 139-143.
- Morita, Y., Tomida, J., and Kawamura, Y. (2012). Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology* **158**, 1071-1083.
- Mulcahy, L. R., Burns, J. L., Lory, S., and Lewis, K. (2010). Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* **192**, 6191-6199.

- Muller, C., Plesiat, P., and Jeannot, K. (2011). A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1211-1221.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587-593.
- Nair, B. M., Cheung, K. J., Jr., Griffith, A., and Burns, J. L. (2004). Salicylate induces an antibiotic efflux pump in *Burkholderia cepacia* complex genomovar III (B. cenocepacia). *J Clin Invest* **113**, 464-473.
- Nehme, D., Li, X. Z., Elliot, R., and Poole, K. (2004). Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in *mexA* compromising MexA multimerization and interaction with MexB. *J Bacteriol* **186**, 2973-2983.
- Nemec, A., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J., van den Broek, P. J., and Dijkshoorn, L. (2007). Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother* **60**, 483-489.
- Nishino, K., Nikaido, E., and Yamaguchi, A. (2009). Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 834-843.
- Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 5803-5812.
- Pai, H., Kim, J., Lee, J. H., Choe, K. W., and Gotoh, N. (2001). Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 480-484.
- Pannek, S., Higgins, P. G., Steinke, P., Jonas, D., Akova, M., Bohnert, J. A., Seifert, H., and Kern, W. V. (2006). Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* **57**, 970-974.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H., and Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60**, 575-608.
- Pearson, J. P., Van Delden, C., and Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**, 1203-1210.
- Peleg, A. Y., Adams, J., and Paterson, D. L. (2007). Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2065-2069.
- Perez, A., Canle, D., Latasa, C., Poza, M., Beceiro, A., Tomas Mdel, M., Fernandez, A., Mallo, S., Perez, S., Molina, F., Villanueva, R., Lasa, I., and Bou, G. (2007). Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3247-3253.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36.
- Piddock, L. J. V. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature reviews* **4**, 629-636.
- Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C., and Nordmann, P. (2003). Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* **41**, 3542-3547.
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X. Z., and Nishino, T. (1996a). Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **21**, 713-724.
- Poole, K., Heinrichs, D. E., and Neshat, S. (1993). Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* **10**, 529-544.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D. E., and Bianco, N. (1996b). Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2021-2028.
- Pos, K. M. (2009a). Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 782-793.
- Pos, K. M. (2009b). Trinity revealed: Stoichiometric complex assembly of a bacterial multidrug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6893-6894.
- Pumbwe, L., Glass, D., and Wexler, H. M. (2006). Efflux pump overexpression in multiple-antibiotic-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3150-3153.
- Pumbwe, L., and Piddock, L. J. (2000). Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2861-2864.
- Pumbwe, L., and Piddock, L. J. (2002). Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol Lett* **206**, 185-189.

- Pumbwe, L., Randall, L. P., Woodward, M. J., and Piddock, L. J. (2004). Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother* **54**, 341-347.
- Putman, M., van Veen, H. W., and Konings, W. N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 672-693.
- Qin, X., Zerr, D. M., McNutt, M. A., Berry, J. E., Burns, J. L., and Kapur, R. P. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* syntrophy in chronically colonized airways of cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 5971-5981.
- Rajamohan, G., Srinivasan, V. B., and Gebreyes, W. A. (2010). Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **65**, 1919-1925.
- Ramos, J. L., Duque, E., Godoy, P., and Segura, A. (1998). Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **180**, 3323-3329.
- Ramos, J. L., Duque, E., Huertas, M. J., and Haidour, A. (1995). Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J Bacteriol* **177**, 3911-3916.
- Ribbeck-Busch, K., Roder, A., Hasse, D., de Boer, W., Martinez, J. L., Hagemann, M., and Berg, G. (2005). A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated *Stenotrophomonas rhizophila*. *Environ Microbiol* **7**, 1853-1858.
- Roca, I., Espinal, P., Marti, S., and Vila, J. (2011). First identification and characterization of an AdeABC-like efflux pump in *Acinetobacter genomospecies 13TU*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1285-1286.
- Roca, I., Marti, S., Espinal, P., Martinez, P., Gibert, I., and Vila, J. (2009). CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4013-4014.
- Rodriguez-Herva, J. J., Garcia, V., Hurtado, A., Segura, A., and Ramos, J. L. (2007). The *tigGHI* solvent efflux pump operon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is located on a large self-transmissible plasmid. *Environ Microbiol* **9**, 1550-1561.
- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J. L., and Segura, A. (2001). Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **183**, 3967-3973.
- Rosenfeld, N., Bouchier, C., Courvalin, P., and Perichon, B. (2012). Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2504-2510.
- Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., and Paulsen, I. T. (2010). Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One* **5**, e8842.
- Ruzin, A., Immermann, F. W., and Bradford, P. A. (2010). RT-PCR and statistical analyses of *adeABC* expression in clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Microb Drug Resist* **16**, 87-89.
- Saito, K., Eda, S., Masada, H., and Nakae, T. (2001). Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **195**, 23-28.
- Saito, K., Yoneyama, H., and Nakae, T. (1999). *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol Lett* **179**, 67-72.
- Sanchez, L., Pan, W., Vinas, M., and Nikaido, H. (1997). The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **179**, 6855-6857.
- Sanchez, P., Alonso, A., and Martinez, J. L. (2002a). Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3386-3393.
- Sanchez, P., Linares, J. F., Ruiz-Diez, B., Campanario, E., Navas, A., Baquero, F., and Martinez, J. L. (2002b). Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* **50**, 657-664.
- Schuldiner, S. (2012). Undecided membrane proteins insert in random topologies. Up, down and sideways: it does not really matter. *Trends Biochem Sci* **37**, 215-219.
- Schweizer, H. P. (1998). Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 394-398.
- Seeger, M. A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K., and Pos, K. M. (2006). Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**, 1295-1298.

- Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003). Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, *mexHI-opmD*, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2990-2992.
- Sennhauser, G., Bukowska, M. A., Briand, C., and Grutter, M. G. (2009). Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **389**, 134-145.
- Senol, E. (2004). *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *J Hosp Infect* **57**, 1-7.
- Shiba, T., Ishiguro, K., Takemoto, N., Koibuchi, H., and Sugimoto, K. (1995). Purification and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* NfxB protein, the negative regulator of the *nfxB* gene. *J Bacteriol* **177**, 5872-5877.
- Sifri, C. D. (2008). Quorum Sensing: Bacteria Talk Sense. In *clinical infectious diseases*, pp. 1070-1076.
- Sigal, N., Fluman, N., Siemion, S., and Bibi, E. (2009). The secondary multidrug/proton antiporter MdfA tolerates displacements of an essential negatively charged side chain. *J Biol Chem* **284**, 6966-6971.
- Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., and Puhler, A. (1986). Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* **118**, 640-659.
- Sivaneson, M., Mikkelsen, H., Ventre, I., Bordi, C., and Filloux, A. (2011). Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Mol Microbiol* **79**, 1353-1366.
- Smith, A. L., Fiel, S. B., Mayer-Hamblett, N., Ramsey, B., and Burns, J. L. (2003). Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis. *Chest* **123**, 1495-1502.
- Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Burns, J. L., Kaul, R., and Olson, M. V. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8487-8492.
- Smith, K. P., Kumar, S., and Varela, M. F. (2009). Identification, cloning, and functional characterization of EmrD-3, a putative multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Vibrio cholerae* O395. *Arch Microbiol* **191**, 903-911.
- Sobel, M. L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P., and Poole, K. (2005a). Mutations in *PA3574 (nalD)* lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1782-1786.
- Sobel, M. L., McKay, G. A., and Poole, K. (2003). Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3202-3207.
- Sobel, M. L., Neshat, S., and Poole, K. (2005b). Mutations in *PA2491 (mexS)* promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 1246-1253.
- Srikumar, R., Paul, C. J., and Poole, K. (2000). Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 1410-1414.
- Srinivasan, V. B., Rajamohan, G., and Gebreyes, W. A. (2009). Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 5312-5316.
- Starr, L. M., Fruci, M., and Poole, K. (2012). Pentachlorophenol induction of the *Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM* efflux operon: involvement of repressors NalC and MexR and the antirepressor ArmR. *PLoS One* **7**, e32684.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., and Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
- Su, X. Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2005). AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4362-4364.
- Sugimura, M., Maseda, H., Hanaki, H., and Nakae, T. (2008). Macrolide antibiotic-mediated downregulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 4141-4144.

- Swick, M. C., Morgan-Linnell, S. K., Carlson, K. M., and Zechiedrich, L. (2011). Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 921-924.
- Tanimoto, K., Tomita, H., Fujimoto, S., Okuzumi, K., and Ike, Y. (2008). Fluoroquinolone enhances the mutation frequency for meropenem-selected carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, but use of the high-potency drug doripenem inhibits mutant formation. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3795-3800.
- Trunck, L. A., Propst, K. L., Wuthiekanun, V., Tuanyok, A., Beckstrom-Sternberg, S. M., Beckstrom-Sternberg, J. S., Peacock, S. J., Keim, P., Dow, S. W., and Schweizer, H. P. (2009). Molecular basis of rare aminoglycoside susceptibility and pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates from Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* **3**, e519.
- Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A., and Saier, M. H., Jr. (1999). The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 107-125.
- Ubarretxena-Belandia, I., and Tate, C. G. (2004). New insights into the structure and oligomeric state of the bacterial multidrug transporter EmrE: an unusual asymmetric homo-dimer. *FEBS Lett* **564**, 234-238.
- Vallet, I., Diggle, S. P., Stacey, R. E., Camara, M., Ventre, I., Lory, S., Lazdunski, A., Williams, P., and Filloux, A. (2004). Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial *cup* gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J Bacteriol* **186**, 2880-2890.
- Vettoretti, L., Plesiat, P., Muller, C., El Garch, F., Phan, G., Attree, I., Ducruix, A., and Llanes, C. (2009). Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1987-1997.
- Viktorov, D. V., Zakharova, I. B., Podshivalova, M. V., Kalinkina, E. V., Merinova, O. A., Ageeva, N. P., Antonov, V. A., Merinova, L. K., and Alekseev, V. V. (2008). High-level resistance to fluoroquinolones and cephalosporins in *Burkholderia pseudomallei* and closely related species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102 Suppl 1**, S103-110.
- Vogne, C., Aires, J. R., Bailly, C., Hocquet, D., and Plesiat, P. (2004). Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1676-1680.
- Vu-Thien, H., Corbineau, G., Hormigos, K., Fauroux, B., Corvol, H., Clement, A., Vergnaud, G., and Pourcel, C. (2007). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **45**, 3175-3183.
- Westbrock-Wadman, S., Sherman, D. R., Hickey, M. J., Coulter, S. N., Zhu, Y. Q., Warrenner, P., Nguyen, L. Y., Shawar, R. M., Folger, K. R., and Stover, C. K. (1999). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2975-2983.
- Westfall, L. W., Carty, N. L., Layland, N., Kuan, P., Colmer-Hamood, J. A., and Hamood, A. N. (2006). *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 247-254.
- Wexler, H. M. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev* **20**, 593-621.
- Wexler, H. M. (2012). Pump it up: Occurrence and regulation of multi-drug efflux pumps in *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe* **18**, 200-208.
- Wiersinga, W. J., van der Poll, T., White, N. J., Day, N. P., and Peacock, S. J. (2006). Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat Rev Microbiol* **4**, 272-282.
- Wigfield, S. M., Rigg, G. P., Kavari, M., Webb, A. K., Matthews, R. C., and Burnie, J. P. (2002). Identification of an immunodominant drug efflux pump in *Burkholderia cepacia*. *J Antimicrob Chemother* **49**, 619-624.
- Woolley, R. C., VEDIYAPPAN, G., Anderson, M., Lackey, M., Ramasubramanian, B., Jiangping, B., Borisova, T., Colmer, J. A., Hamood, A. N., McVay, C. S., and Fralick, J. A. (2005). Characterization of the *Vibrio cholerae* *vceCAB* multiple-drug resistance efflux operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 5500-5503.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* **36**, 1251-1275.
- Yamamoto, M., Ueda, A., Kudo, M., Matsuo, Y., Fukushima, J., Nakae, T., Kaneko, T., and Ishigatsubo, Y. (2009). Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of *mexXY* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **155**, 3312-3321.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

- Yu, E. W., Aires, J. R., McDermott, G., and Nikaido, H. (2005). A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *J Bacteriol* **187**, 6804-6815.
- Zaoui, C., Overhage, J., Lons, D., Zimmermann, A., Musken, M., Bielecki, P., Pustelny, C., Becker, T., Nimtz, M., and Haussler, S. (2012). An orphan sensor kinase controls quinolone signal production via MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **83**, 536-547.
- Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, Weist K, Goossens M M, Vaerenberg S, Hopkins S, Catry B, Monnet D L, Goossens H, and Suetens C (2012). The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Eurosurveillance* **17**.
- Zgurskaya, H. I. (2002). Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* **292**, 95-105.
- Zhang, L., Li, X. Z., and Poole, K. (2001). SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3497-3503.
- Zhao, Q., Li, X. Z., Srikumar, R., and Poole, K. (1998). Contribution of outer membrane efflux protein OprM to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independent of MexAB. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1682-1688.
- Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Kohler, T., Pechere, J. C., and Plesiat, P. (1999). *In vivo* emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 287-291.